

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



61
15
76

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|--|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/00 | | A2 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/59040 |
| | | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Dezember 1998 (30.12.98) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/03468 | | (81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Juni 1998 (09.06.98) | | Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> | |
| (30) Prioritätsdaten: 197 26 329.1 20. Juni 1997 (20.06.97) DE 198 13 274.3 26. März 1998 (26.03.98) DE 198 16 496.3 14. April 1998 (14.04.98) DE | | | |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE). | | | |
| (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAGEN, Gustav [DE/DE]; Walter-Flex-Strasse 32, D-51373 Leverkusen (DE). SIEGMUND, Hans-Ulrich [DE/DE]; Quettinger Strasse 167, D-51381 Leverkusen (DE). WEICHEL, Walter [DE/DE]; Dhünner Aue 15, D-51519 Odenthal (DE). WICK, Maresa [DE/DE]; Andreas-Gryphius-Strasse 26, D-51065 Köln (DE). ZUBOV, Dmitry [RU/DE]; Roggendorfstrasse 59, D-51061 Köln (DE). | | | |
| (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE). | | | |
| (54) Title: HUMAN CATALYTIC TELOMERASE SUB-UNIT AND ITS DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USE | | | |
| (54) Bezeichnung: HUMANE KATALYTISCHE TELOMERASE-UNTEREINHEIT UND DEREN DIAGNOSTISCHE UND THERAPEUTISCHE VERWENDUNG | | | |
| (57) Abstract <p>The invention relates to the nucleotide sequence and the protein sequence derived therefrom, which encodes for the human catalytic telomerase sub-unit. The invention furthermore relates to methods involving a pharmaceutical, diagnostic or therapeutic use of this gene/protein, principally for treating cancer and ageing.</p> | | | |
| (57) Zusammenfassung <p>Diese Erfindung betrifft die Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Proteinsequenz, die für die humane katalytische Telomerase-Untereinheit codiert. Darüberhinaus betrifft diese Erfindung Methoden, die eine pharmazeutische, diagnostische oder therapeutische Verwendung von diesem Gen/Protein beinhaltet, vor allem in der Behandlung von Krebs und Alterung.</p> | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------|----|-----------------------------|----|------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | | Republik Mazedonien | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | ML | Mali | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MN | Mongolei | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MR | Mauretanien | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MW | Malawi | US | Vereinigte Staaten von |
| CA | Kanada | IT | Italien | MX | Mexiko | | Amerika |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CM | Kamerun | | Korea | PL | Polen | | |
| CN | China | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CU | Kuba | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CZ | Tschechische Republik | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| DE | Deutschland | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DK | Dänemark | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| EE | Estland | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

Humane katalytische Telomerase-Untereinheit und deren diagnostische und therapeutische Verwendung

5 Aufbau und Funktion der Chromosomenenden

Das genetische Material eukaryontischer Zellen ist auf linearen Chromosomen verteilt. Die Enden der Erbanlagen werden, abgeleitet von den griechischen Wörtern *telos* (Ende) und *meros* (Teil, Segment), als Telomere bezeichnet. Die meisten Telomere bestehen aus
10 Wiederholungen von kurzen Sequenzen, die überwiegend aus Thymin und Guanin aufgebaut sind (Zakian, 1995). Die Telomersequenzen verwandter Organismen sind oft ähnlich und sogar zwischen phylogenetisch weiter entfernten Spezies konserviert. Bemerkenswert ist, daß in allen bislang untersuchten Wirbeltieren die Telomere aus der Sequenz TTAGGG aufgebaut werden (Meyne *et al.*, 1989).

15 Die Telomere üben verschiedene wichtige Funktionen aus. Sie verhindern die Fusion von Chromosomen (McClintock, 1941) und damit die Entstehung von dizentrischen Erbanlagen. Solche Chromosomen mit zwei Centromeren können durch Verlust der Heterozygotie bzw. Verdopplung oder Verlust von Genen zur Entwicklung von Krebs führen.

20 Desweiteren dienen Telomere dazu, intakte Erbanlagen von beschädigten zu unterscheiden. So stellten Hefezellen ihre Zellteilung ein, wenn sie ein Chromosom ohne Telomer enthielten (Sandell und Zakian, 1993).

25 Eine weitere wichtige Aufgabe erfüllen Telomere bei der DNA-Replikation eukaryontischer Zellen. Im Gegensatz zu den zirkulären Genomen von Prokaryonten können die linearen Chromosomen der Eukaryonten von dem DNA Polymerase-Komplex nicht vollständig repliziert werden. Zur Initiation der DNA-Replikation sind RNA-Primer notwendig. Nach Abspaltung der RNA-Primer, Verlängerung der Okazaki-Fragmente und anschließender
30 Ligation fehlt dem neu-synthetisierten DNA-Strang das 5'-Ende, denn dort kann der RNA-Primer nicht durch DNA ersetzt werden. Ohne besondere Schutzmechanismen würden daher die Chromosomen mit jeder Zellteilung schrumpfen ("end-replication problem";

Harley *et al.*, 1990). Die nicht-kodierenden Telomersequenzen stellen vermutlich eine Pufferzone dar, um dem Verlust von Genen vorzubeugen (Sandell und Zakian, 1993).

Darüberhinaus spielen Telomere auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären Alterung (Olovnikov, 1973). Humane somatische Zellen zeigen in Kultur eine limitierte Replikationskapazität; sie werden nach einer gewissen Zeit seneszent. In diesem Zustand teilen sich die Zellen selbst nach Stimulierung mit Wachstumsfaktoren nicht mehr, sterben aber nicht, sondern bleiben metabolisch aktiv (Goldstein, 1990). Verschiedene Beobachtungen sprechen für die Hypothese, daß eine Zelle anhand der Länge ihrer Telomere bestimmt, wie oft sie sich noch teilen kann (Allsopp *et al.*, 1992).

Zusammenfassend besitzen die Telomere somit zentrale Funktionen bei der Alterung von Zellen sowie der Stabilisierung des genetischen Materials und Verhinderung von Krebs.

Das Enzym Telomerase synthetisiert die Telomere

Wie oben beschrieben können Organismen mit linearen Chromosomen ohne einen speziellen Schutzmechanismus ihr Genom nur unvollständig replizieren. Die meisten Eukaryonten verwenden zur Regeneration der Telomersequenzen ein spezielles Enzym, die Telomerase. In den bislang untersuchten Einzellern wird Telomerase konstitutiv expremiert. Dagegen wurde in Menschen die Telomerase-Aktivität nur in Keimzellen und Tumorzellen gemessen, wogegen benachbartes somatisches Gewebe keine Telomerase enthielt (Kim *et al.*, 1994).

Telomerase in Ciliaten

Die Telomerase wurde, wie auch die Telomere, zuerst im Ciliaten *Tetrahymena thermophila* identifiziert. Die Telomerase-Aktivität wurde durch Verlängerung des einzelsträngigen Oligonukleotides d(TTGGGG)₄ in Gegenwart von dTTP und dGTP nachgewiesen (Greider und Blackburn, 1985). Dabei wurde an den Primer wiederholt die *Tetrahymena*-Telomersequenz TTGGGG angehängt. Selbst wenn als Ausgangsmaterial ein Oligonukleotid mit der unregelmäßigen Telomersequenz von *Saccharomyces cerevisiae*, T(G)₁₋₃, angeboten wurde, verlängerte die Telomerase den Primer mit der Telomersequenz

von *Tetrahymena* (Greider und Blackburn, 1985). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß die Telomerase selbst die Vorlage für die Sequenz der Telomere mit sich führt.

5 Nachdem zunächst die Existenz einer RNA-Komponente in der Telomerase nachgewiesen werden konnte (Greider und Blackburn, 1987), wurde kurze Zeit später das Gen für die RNA-Untereinheit der Telomerase kloniert (Greider und Blackburn, 1989). Diese RNA enthält eine Region mit dem Komplement zur Telomersequenz von *Tetrahymena* (nachfolgend "Komplement-Region" genannt). Die Telomerase-Aktivität war abhängig von
10 der RNA-Komponente, was durch Verdau der RNA mit nachfolgendem Verlust der Aktivität gezeigt werden konnte. Wurde die Telomerase-RNA in ihrer Komplement-Region mutiert, so wurden die entsprechenden Mutationen *in vivo* in die Telomere von *Tetrahymena* eingebaut (Yu *et al.*, 1990). Die Telomerase gehört demnach zur Klasse der RNA-abhängigen DNA-Polymerasen.

15 Die ersten Protein-Untereinheiten der *Tetrahymena*-Telomerase, p80 und p95, wurden 1995 identifiziert (Collins *et al.*, 1995). Die Beobachtung, daß p95 das Enzym an der DNA verankert und p80 die RNA-Komponente bindet, führte zu folgendem Modell: Die Telomerase-RNA lagert sich mit ihrer Komplement-Region an den einzelsträngigen 3'-Überhang an. Die Verlängerung des 3'-Überhangs geschieht durch Einbau der
20 entsprechenden Nukleotide in 5'-3'-Richtung. Die *de novo*-Synthese von Telomeren beinhaltet wahrscheinlich einen Elongations- und einen Translokationsschritt. Ist eine Telomersequenz synthetisiert worden, bewegt sich die Telomerase vermutlich an der DNA entlang, bis sie wieder in einer Position ist, um eine vollständige Telomersequenz
25 hinzuzufügen. Dieses Modell muß nicht allgemeingültig sein, denn zwischen Telomerasen unterschiedlicher Spezies bestehen große Unterschiede in der Anzahl der Nukleotide, die das Enzym addiert bevor es vom Telomer dissoziiert (Prowse *et al.*, 1993).

Darüberhinaus wurden kürzlich auch Telomerase-Untereinheiten anderer Organismen
30 identifiziert. In dem Ciliaten *Euplotes aediculatus* wurden zwei Protein-Untereinheiten, p123 und p43, gefunden, welche keine Homologie zu den *Tetrahymena*-Telomerase-Proteinen zeigen. Die Telomerase-Untereinheit p123 weist an ihrem N-Terminus eine

basische Domäne und am C-Terminus eine Domäne für eine Reverse Transkriptase (RT) auf, was auf eine katalytische Funktion dieses Proteins hindeutet (Lingner *et al.*, 1997). Darüberhinaus wurde eine signifikante Homologie von p123 zu dem von Lundblad gefundenen Protein Est2 aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Lingner *et al.*, 1997).

5

Während für p80 und p95 bisher keine essentielle Funktion für die Telomeraseaktivität nachgewiesen wurde, konnte für die potentiellen katalytischen Untereinheiten der Telomerase p123/est2p eindeutig eine Schlüsselfunktion aufgezeigt werden: Eine Mutation des RT-Aktivitätszentrums von est2p führte zu einer signifikanten Verkürzung der Telomere in Hefezellen (Lingner *et al.*, 1997).

10

Telomerase-Komponenten aus Säugerzellen

Inzwischen wurden die RNA-Komponenten der Telomerasen von verschiedenen Organismen, unter anderem von *Saccharomyces cerevisiae*, Mäusen und Menschen (Singer und Gottschling, 1994; Blasco *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1995), kloniert. Alle bislang bekannten Telomerase-RNAs enthalten eine Region, die komplementär zu der Telomersequenz des jeweiligen Organismus ist. Die Primärsequenz der humanen Telomerase-RNA (hTR) weist jedoch keine Ähnlichkeiten mit den RNA-Komponenten der Ciliaten oder *Saccharomyces cerevisiae* auf. Dagegen existieren konservierte Bereiche zwischen der humanen und der murinen Telomerase-RNA (Feng *et al.*, 1995).

15

20

Vor kurzem wurde die Isolation eines humanen Telomerase-assoziiertes Proteins (hTP1) beschrieben (Harrington *et al.*, 1997). Das korrespondierende Gen wurde aufgrund seiner Homologie zu der *Tetrahymena* Telomerase Untereinheit p80 in einer nicht der Allgemeinheit zugänglichen EST Datenbank gefunden (Harrington *et al.*, 1997). hTP1 ist aus 2627 Aminosäuren zusammengesetzt und zeigt im N-Terminus drei Domänen, welche maximal zu 46% homolog zu p80 sind. Als weiteres Strukturelement konnten im C-terminalen Bereich 16 Wiederholungen aus den Aminosäuren Tryptophan und Asparagin aufgezeigt werden, die vermutlich eine Protein-Protein Interaktion vermitteln.

25

30

Aktivierung der Telomerase in menschlichen Tumoren

Eine Aktivität der Telomerase konnte in Menschen ursprünglich nur in Keimbahnzellen, nicht aber in normalen somatischen Zellen (Hastie *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Nach der Entwicklung eines sensitiveren Nachweisverfahrens (Kim *et al.*, 1994) wurde auch in hematopoietischen Zellen eine geringe Telomeraseaktivität detektiert (Broccoli *et al.*, 1995; Counter *et al.*, 1995; Hiyama *et al.*, 1995). Allerdings wiesen diese Zellen trotzdem eine Reduktion der Telomere auf (Vaziri *et al.*, 1994; Counter *et al.*, 1995). Noch ist nicht geklärt, ob die Menge an Enzym in diesen Zellen nicht ausreichend für eine Kompensation des Telomerverlustes ist, oder ob die gemessene Telomerase-Aktivität von einer Subpopulation, z.B. unvollständig ausdifferenzierten CD34⁺38⁺-Vorläuferzellen, herrührt (Hiyama *et al.*, 1995). Zur Klärung wäre ein Nachweis der Telomerase-Aktivität in einer einzelnen Zelle nötig.

Interessanterweise wurde jedoch in einer großen Zahl der bislang getesteten Tumorgewebe eine signifikante Telomerase-Aktivität nachgewiesen (1734/2031, 85%; Shay, 1997), während in normalem somatischen Gewebe keine Aktivität gefunden wurde (1/196, <1%, Shay, 1997). Verschiedene Untersuchungen zeigten außerdem, daß in seneszenten Zellen, die mit viralen Oncoproteinen transformiert wurden, die Telomere weiterhin schrumpften und Telomerase nur in der Subpopulation entdeckt werden konnte, die die Wachstumskrise überlebte (Counter *et al.*, 1992). In diesen immortalisierten Zellen waren auch die Telomere stabil (Counter *et al.*, 1992). Ähnliche Befunde aus Untersuchungen an Mäusen (Blasco *et al.*, 1996) stützen die Annahme, daß eine Reaktivierung der Telomerase ein spätes Ereignis in der Tumorgenese ist.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine "Telomerase-Hypothese" entwickelt, die den Verlust von Telomersequenzen und Zellalterung mit der Aktivität von Telomerase und der Entstehung von Krebs verbindet. In langlebigen Spezies wie dem Menschen kann das Schrumpfen der Telomere als ein Mechanismus zur Tumorsuppression angesehen werden. Ausdifferenzierte Zellen, die keine Telomerase enthalten, stellen bei einer bestimmten Länge der Telomere ihre Zellteilung ein. Mutiert eine solche Zelle, so kann aus ihr nur dann ein Tumor entstehen, wenn die Zelle ihre Telomere verlängern kann. Ansonsten würde die Zelle

weiterhin Telomersequenzen verlieren, bis ihre Chromsomen instabil werden und sie schließlich zugrunde geht. Die Reaktivierung der Telomerase ist vermutlich der Hauptmechanismus von Tumorzellen zur Stabilisation ihrer Telomere.

- 5 Aus diesen Beobachtungen und Überlegungen ergibt sich, daß eine Inhibition der Telomerase eine Therapie von Tumoren erlauben sollte. Konventionelle Krebstherapien mit Zytostatika oder kurzwelligen Strahlen schädigen nicht nur die Tumorzellen, sondern alle sich teilenden Zellen des Körpers. Da aber außer Tumorzellen nur Keimbahnzellen eine signifikante Telomerase-Aktivität enthalten, würden Telomerase-Inhibitoren spezifischer die
- 10 Tumorzellen angreifen und somit weniger unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. In allen bislang getesteten Tumorgeweben wurde eine Telomerase-Aktivität nachgewiesen, so daß diese Therapeutika gegen alle Krebsarten eingesetzt werden könnten. Die Wirkung von Telomerase-Inhibitoren würde dann eintreten, wenn die Telomere der Zellen sich soweit verkürzt haben, daß das Genom instabil wird. Da Tumorzellen meist kürzere Telomere
- 15 aufweisen als normale somatische Zellen, würden zuerst Krebszellen durch Telomerase-Inhibitoren eliminiert werden. Zellen mit langen Telomeren, wie die Keimzellen, würden dagegen erst viel später geschädigt werden. Telomerase-Inhibitoren stellen somit einen zukunftsweisenden Weg für die Therapie von Krebs dar.
- 20 Eindeutige Antworten auf die Frage nach der Art und den Angriffspunkten physiologischer Telomerase-Inhibitoren werden aber erst möglich sein, wenn auch die Proteinstrukturen des Enzyms mit ihren Funktionen identifiziert und die Erkenntnisse über verschiedene Telomer-bindende Proteine vertieft sind.
- 25 Die Erfindung betrifft die katalytisch aktive humane Telomerase-Untereinheit (phTC) gegebenenfalls in aufgereinigter Form, aktive Teile des Proteins, Modulatoren, insbesondere Agonisten des Proteins, die Funktion des Proteins imitierende Substanzen sowie Kombinationen aus diesen Komponenten.

Die Erfindung betrifft weiterhin:

- Die Nucleinsäuresequenz, die für das humane Protein phTC kodiert, im einzelnen:
 - 5 - die genomische Sequenz des hTC-Gens,
 - die cDNA-Sequenz des hTC-Gens ,
 - die DNA-Sequenz von hTC-Varianten
 - die Sequenz der mRNA, die vom hTC Gen transkribiert wird,
 - Teile aus den oben genannten Sequenzen, darunter die in der Fig. 1 gezeigte
 - 10 DNA Sequenz (SEQ ID No. 1) von hTC.

- Die Nucleinsäuresequenzen, die in anderen Säugern für dem hTC homologe Proteine kodieren, im einzelnen:
 - 15 - die genomischen Sequenzen hTC-homologer Gene,
 - die cDNA-Sequenzen hTC-homologer Gene,
 - die Sequenzen der mRNAs, die von hTC-homologen Genen transkribiert werden,
 - Teile aus den oben genannten Sequenzen.
 - 20

- Nucleinsäuresequenzen, die für dem Protein phTC verwandte Proteine im Menschen und anderen Säugern kodieren, im einzelnen:
 - die genomischen Sequenzen hTC-verwandter Gene in Mensch und anderen
 - 25 Säugern,
 - die cDNA-Sequenzen hTC-verwandter Gene in Mensch und anderen Säugern,
 - die Sequenzen der mRNAs, die von hTC-verwandten Genen transkribiert werden in Mensch und anderen Säugern,
 - 30 - Teile aus den oben genannten Sequenzen.

- Das oben beschriebene phTC Protein, isoliert aus Säugerzellen (vgl. Fig. 2 und SEQ ID No. 2).
- Das phTC Protein, markiert mit einem Nachweis-Reagenz, wobei das Nachweis-Reagenz bevorzugt ein Enzym, ein radioaktiv markiertes Element oder eine fluoreszierende Chemikalie ist.
- Einen Antikörper, der gegen das phTC Protein gerichtet ist.

10 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist dies ein polyklonaler Antikörper.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist dies ein monoklonaler Antikörper.

15 Solche Antikörper können beispielsweise produziert werden durch die Injektion eines substantiell immunkompetenten Wirts mit einer für die Antikörper-Produktion effektiven Menge eines phTC Polypeptids oder eines Fragments davon und durch nachfolgende Gewinnung dieses Antikörpers.

20 Weiterhin läßt sich in an sich bekannter Weise eine immortalisierte Zelllinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert.

Die Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweisreagenz markiert sein.

25 Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen.

Bevorzugte Beispiele für ein solches Nachweis-Reagenz sind Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin.

30

- Oligonukleotide in aufgereinigter Form mit einer Sequenz, die identisch oder exakt komplementär ist zu einer 10 bis 500 Nukleotide langen, zusammenhängenden Sequenz der oben beschriebenen genomischen DNA, cDNA oder mRNA.

5 Ein solches Oligonukleotid kann insbesondere ein Oligodesoxyribonucleotid oder ein Oligoribonucleotid oder eine Peptidnukleotidsäure (PNA) sein

Bevorzugt sind Oligonukleotide, welche die Aktivität der Telomerase inhibieren, reprimieren oder blockieren, wenn sie an die hTC mRNA binden.

10

- Eine DNA Sequenz oder eine degenerierte Variation dieser Sequenz, die das Protein phTC oder ein Fragment dieses Proteins kodiert, gegebenenfalls enthaltend die DNA Sequenz aus Abbildung 1, oder DNA Sequenz, die mit der vorgehend aufgeführten DNA Sequenz unter Standard-Hybridisierungsbedingungen hybridisiert.

15

- Ein rekombinantes DNA Molekül, das eine DNA Sequenz oder eine degenerierte Variation dieser Sequenz beinhaltet, die phTC oder ein Fragment von phTC kodiert, wobei letztere Sequenz bevorzugt die DNA Sequenz aus Abbildung 1 enthält, oder das eine solche DNA Sequenz beinhaltet, die mit der vorgehend aufgeführten DNA Sequenz unter Standard-Hybridisierungsbedingungen hybridisiert.

20

Bevorzugt ist in dem oben genannten rekombinanten DNA Molekül die beschriebene DNA mit einer Expressions-Kontrollsequenz verbunden.

25

Besonders bevorzugt als Expressions-Kontrollsequenz sind z.B. der frühe oder späte Promotor des SV40- oder Adenovirus, das lac System, das trp System, das TAC System, das TRC System, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Phagen λ , die Kontrollregionen des fd Hüllproteins, der Promotor der 3-Phosphoglycerat Kinase, der Promotor der Sauren Phosphatase und der Promotor des α -Mating Faktors der Hefe.

30

- Einen einzelligen Wirt, der mit einem oben beschriebenen rekombinanten DNA Molekül transformiert wurde, das die DNA Sequenz oder eine degenerierte Variante dieser Sequenz enthält, die für das phTC Protein oder einen Teil dieses Protein kodiert. In diesem rekombinanten DNA-Molekül ist die besagte DNA Sequenz mit einer Expressions-Kontrollsequenz verknüpft.

Bevorzugte Beispiele für den einzelligen Wirt sind: *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, yeasts, CHO, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 und BMT10 Zellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerzellen in Zellkultur.

- Einen rekombinanten Virus, der mit einem der vorstehend beschriebenen DNA Moleküle oder einem Derivat oder Fragment dieses Moleküls transformiert wird.
- Eine Methode zur Inhibition der Telomeraseaktivität in humanen Zellen, bevorzugt neoplastische Zellen, bei der ein exogenes Polynukleotid in die Zellen transferiert wird, das aus einer Transkriptionseinheit besteht. Diese Transkriptionseinheit beinhaltet eine Polynukleotidsequenz aus mindestens 29 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die substantiell identisch oder substantiell komplementär zur hTC RNA Sequenz ist und die mit einer heterologen Transkriptions-regulatorischen Sequenz verknüpft ist, die die Transkription des verknüpften Polynukleotids in besagten Zellen steuert.

Bevorzugt enthält die oben genannte heterologe Transkriptions-regulatorische Sequenz einen Promotor, der in humanen Zellen konstitutiv aktiv ist.

Alternativ kann die heterologe Transkriptions-regulatorische Sequenz einen Promotor enthalten, der in humanen Zellen durch Zugabe einer regulatorischen Substanz induziert oder reprimiert werden kann. Dazu zählen beispielsweise induzierbare und reprimierbare Tetrazyklin-abhängige Promotoren, Heatshock-Promotoren, Metallionen-abhängige Promotoren.

Das obengenannte exogene Polynukleotid kann beispielsweise ein virales Genom mit einer Transkriptionseinheit aus der humanen hTC DNA-Komponente sein.

5 Besonders bevorzugt produziert die besagte Transkriptionseinheit antisense RNA, die substantiell komplementär zur humanen hTC RNA-Komponente ist.

Weiterhin besonders bevorzugt kann das exogene Polynukleotid die Sequenz aus Abb. 1 enthalten.

10 - Ein Polynukleotid für die Gentherapie einer menschlichen Krankheit. Dieses Polynukleotid besteht aus einer Transkriptionseinheit, die eine Polynukleotidsequenz aus mindestens 9 aufeinanderfolgenden Nukleotiden enthält, die substantiell identisch oder substantiell komplementär zur hTC RNA Sequenz ist und die mit einer heterologen Transkriptions-regulatorischen Sequenz verknüpft ist, die die
15 Transkription des verknüpften Polynukleotids in besagten Zellen steuert.

- Eine Methode zur Detektion Telomerase-assoziiierter Zustände in einem Patienten, die folgende Schritte umfaßt:

- 20 A. Detektion des phTC Proteins in Körperflüssigkeiten oder zellulären Proben, um einen diagnostischen Wert zu erhalten;
- B. Vergleich des diagnostischen Werts mit Standardwerten für das phTC Protein in standardisierten normalen Zellen oder Körperflüssigkeiten des gleichen Typs wie die Testprobe;
- 25 C. Detektion diagnostischer Werte, die höher oder niedriger als Standardvergleichswerte liegen, indizieren einen Telomerase-assoziierten Zustand, der wiederum einen pathogenen Zustand indiziert.

 Bevorzugt wird diese Methode eingesetzt zur Detektion einer neoplastischen
30 Erkrankung eines Patienten. Die Methode umfaßt dann folgende Schritte:

- A. Detektion des phTC Proteins in zellulären Proben, um einen diagnostischen Wert zu erhalten;
- B. Vergleich des diagnostischen Werts mit Standardwerten für das phTC Protein in nicht-neoplastischen Zellen des gleichen Typs wie die Testprobe;
- 5 C. Diagnostische Werte, die deutlich höher als Standardvergleichswerte liegen, indizieren einen neoplastischen Zustand.

- Eine Methode zur Bestimmung der Gegenwart des phTC Proteins in einer Zelle oder zellulären Probe, die auf der Amplifikation eines hTC-Polynukleotids oder

10 Hybridisierung eines hTC-Polynukleotids, Primers oder einer hTC komplementären Sequenz mit einem hTC Polynukleotid beruhen.

- Ein Testkit zum Nachweis von phTC in zellulären Proben und Körperflüssigkeiten, wobei markierte, immunchemisch-reaktive Komponenten beispielsweise sein

15 können: polyklonale Antikörper gegen phTC, monoklonale Antikörper gegen phTC, Fragmente dieser Antikörper oder einem Gemisch aus diesen Komponenten.

- Eine Methode zur Verhinderung und/oder Behandlung zellulärer (Zer-) Störung und/oder Fehlfunktion und/oder anderer Krankheitsbilder im Menschen, die auf der

20 Gabe einer therapeutisch effektiven Menge an katalytisch aktiver humaner Telomerase, ihrer funktionellen Äquivalente oder ihrer katalytisch aktiven Fragmente beruht. Ebenfalls denkbar ist der Einsatz einer Substanz, die die Produktion und/oder Aktivität von phTC fördert; eine Substanz, die die Aktivität von phTC imitieren kann; einer Substanz, die die Produktion und/oder Aktivität von phTC

25 inhibieren kann oder eines Gemisches dieser Substanzen. Weiterhin kann ein spezifischer Bindungspartner eingesetzt werden.

Bevorzugt wird die Methode eingesetzt zur Verhinderung oder Behandlung der

Alterung oder von Krebserkrankungen.

30

Substanzen, die die Aktivität von phTC beeinflussen, d.h. inhibieren oder fördern, können, werden hier als Modulatoren bezeichnet. Solche Modulatoren können in an

sich bekannter Weise gefunden werden, wenn man in einem Telomerase-Assay ihren Einfluß auf die Telomerase-Aktivität prüft. Beispiele für Telomerase-Assays sind im Rahmen von Beispiel 15 angegeben.

5 Modulatoren der phTC sind interessant zur Behandlung von Krankheiten, die mit Telomerase in Zusammenhang stehen. Insbesondere seien hier die Verhinderung oder Behandlung von Alterungsprozessen oder von Krebserkrankungen genannt.

10 - Eine antisense-Nukleinsäure gegen die hTC mRNA, die eine Nukleotidsequenz enthält, die mit besagter mRNA hybridisiert, wobei die antisense-Nukleinsäure eine RNA oder eine DNA ist.

Bevorzugt bindet die antisense-Nukleinsäure an das Start-Kodon der jeweiligen mRNAs.

15 - Ein rekombinantes DNA Molekül mit einer DNA Sequenz, von der bei der Transkription eine antisense-Ribonukleinsäure gegen die hTC mRNA produziert wird. Diese besagte antisense-Ribonukleinsäure enthält eine Nukleinsäuresequenz, die mit der besagten hTC mRNA hybridisieren kann.

20 Ein solches DNA-Molekül kann zur Herstellung einer Zelllinie mit reduzierter Expression von phTC eingesetzt werden, indem man eine phTC-produzierende Zelllinie mit diesem rekombinanten DNA Molekül transfiziert.

25 - Ein Ribozym, das die hTC mRNA spaltet.

Bevorzugt ist dies ein *Tetrahymena*-Typ Ribozym oder ein Hammerhead-Typ Ribozym.

30 - Ein rekombinantes DNA Molekül mit einer DNA Sequenz, deren Transkription zur Produktion eines solchen Ribozyms führt.

Dieses rekombinante DNA-Molekül kann eingesetzt werden um eine phTC-produzierende Zelllinie zu transfizieren.

- 5 - Eine Zusammenstellung, bestehend aus einem Paar von humanen hTC Polynukleotid-PCR Primern, wobei die Primer bevorzugt aus Sequenzen bestehen, die mit der Sequenz der humanen hTC mRNA korrespondieren oder zu dieser Sequenz komplementär sind.
- 10 - Eine Zusammenstellung, die eine Polynukleotid-Hybridisierungs-sonde für das humane hTC Gen enthält, wobei die Sonde bevorzugt mindestens 29 aufeinanderfolgende Nukleotide enthält, die mit der Sequenz des humanen hTC Gens korrespondieren oder zu dieser komplementär sind.
- 15 - Tiermodelle, mit denen die Telomerase/Telomer-Regulation *in vivo* untersucht werden kann. So können z.B. mit Knockout- oder transgenen Tieren Tumorentstehung und Alterung direkt untersucht werden.

20 Funktionelle Äquivalente sind im Fall von Proteinen oder Peptiden solche Verbindungen, die sich zwar hinsichtlich der Aminosäuresequenz unterscheiden können, aber im wesentlichen dieselben Funktionen haben.

Bekannte Beispiele hierfür sind Isoenzyme bzw. sogenannte Mikroheterogenitäten bei Proteinen.

25 Im Fall der Oligo- oder Polynucleinsäuren sollten unter funktionellen Äquivalenten solche Verbindungen verstanden werden, die sich in der Nucleotid-Sequenz unterscheiden, aber für das selbe Protein codieren. Dies ist z.B. auf den degenerierten genetischen Code zurückzuführen.

30 Erläuterung der Abbildungen:

Fig. 1: cDNA Sequenz der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit (hTC) (SEQ ID No. 1).

Fig. 2: Abgeleitete Aminosäuresequenz von der in Fig.1 dargestellten hTC DNA Sequenz (SEQ ID No. 2).

Die in Fig. 1 dargestellte DNA Sequenz läßt sich von Position 64 bis Position 3461 vollständig in eine Aminosäuresequenz translatieren. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt.

Fig. 3: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit unterschiedlich vorbehandelter DNA von AA281296.

Die Abbildung zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes 0,8%iges Agarosegel. In den Spuren 1 und 8 sind zwei verschiedene DNA Größenstandards aufgetragen, wobei die DNA Fragmentlängen 3, 2, 0.5 und 0.4 kb hervorgehoben sind. Die AA281296 DNA in pT7T3D wurde mit den Restriktionsenzymen Eco RI /Not I (Spur 3), Pst I (Spur 6) und Xho I (Spur 7) verdaut. Auf die Spur 2 wurde unverdaute DNA von AA281296 in pT7T3D aufgetragen. In den Spuren 4 und 5 wurde 1/10 eines PCR-Ansatzes (1 Minute 94°C, 2 Minuten 60°C, 3 Minuten 72°C) mit der hTC cDNA in pT7T3D und den Primern 1 (5' GAGTGTGTACGTC-GTCGAGCTGCTCAGGTC 3') und 4 (5' CACCCTCGAGGTGAGACGCTCGGCC 3') [Spur 4] bzw. mit den Primern 6 (5' GCTCGTAGTTGAGCACGCTGAACAGTG 3') und 7 (5' GCCAAGTTCCTGCACTGGCTGATGAG 3') [Spur 5] appliziert.

Fig. 4: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* p123 (p123) und Mensch (phTC).

Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Proteinvergleich mit der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen p123 von *Euplotes aediculatus* und dem identifizierten EST₁ identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben.

Nicht identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch ein : gekennzeichnet.

Fig. 5: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* p123 (p123), und Hefe (est2p).

Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Proteinvergleich mit der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen p123 von *Euplotes aediculatus* und est2p von Hefe identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Nicht identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch ein : gekennzeichnet.

Fig. 6: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von Hefe (est2p) und Mensch (phTC).

Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Proteinvergleich mit der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen est2p von Hefe und dem identifizierten EST₊1 identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Nicht identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch ein : gekennzeichnet.

Fig. 7: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* p123 (p123), Hefe (est2p) und Mensch (phTC).

Der in der Fig. 5 dargestellte Vergleich zwischen *Euplotes* p123 (p123), Hefe (est2p) und Mensch (phTC) wurde mit dem Clustal Method Subprogramm der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen est2p von Hefe, p123 von *Euplotes aediculatus* und dem

identifizierten EST₁ identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Zusätzlich sind die Bereiche, die zwischen allen drei Proteinen identisch sind, durch einen hellgrauen Balken oberhalb der Proteinsequenz gekennzeichnet.

5

Fig. 8: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 6 (RACE Runde 1) (SEQ ID No. 3).

Fig. 9: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 6 (RACE Runde 2) (SEQ ID No. 4).

10 Fig.10: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 6 (RACE Runde 3) (SEQ ID No. 5).

Fig.11: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 8 (RACE Runde 3) (SEQ ID No. 6).

15 Fig.12: Übersicht zur Klonierung der vollständigen hTC cDNA. Die Positionen der Start- und Stopcodons sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die schwarzen Bereiche der Rechtecke symbolisieren für Protein kodierende Sequenzabschnitte, während die hellgrauen Bereiche 5' und 3' untranslatierte cDNA Regionen symbolisieren bzw. für Intronsequenzen stehen. Die dunkelgrauen Blöcke im Rechteck für die Full length cDNA stehen entweder für das Telomerase-spezifische Motiv (T), oder für die sieben Reverse Transkriptase Motive (Nummer 1-7).

20 Die DNA-Fragmente, die zur Darstellung der vollständigen hTC cDNA notwendig sind, sind ebenfalls als Rechtecke dargestellt und entsprechend ihrer Herkunft gekennzeichnet. Alle Rechtecke sind in ihrer Position relativ zueinander angeordnet. Die Herkunft des DNA-Fragments, für das das Rechteck AA261296 steht, ist in Beispiel 2 beschreiben. Die relative Position der 182 bp Deletion in diesem Fragment (vergleiche Beispiel 2) ist durch eine Lücke im Rechteck gekennzeichnet. Die Herkunft der DNA-Fragmente, für die die Rechtecke RACE1, RACE2 und RACE3 stehen, sind in Beispiel 6 beschreiben. Die Herkunft des DNA-Fragments, für das das Rechteck C5F-Fragment steht, ist in Beispiel 7 beschreiben. Die Herkunft des DNA-Fragments, für das das Rechteck Lambda12 steht, ist in Beispiel 9 beschreiben. Der 3' Teil in dem DNA-Fragment Lambda 12, der für eine nicht mit hTC in Verbindung stehende cDNA codiert (vergleiche Beispiel 9), ist in dieser Ab-

25

30

bildung nicht dargestellt. Die vollständige hTC-cDNA Sequenz wurde unter Verwendung der in dieser Abbildung dargestellten DNA-Fragmente Lambda 12 und C5F an den 5' und 3' Splicestellen zusammengefügt (vergleiche Beispiel 7) Diese Splicestellen wurden in diversen Fragmenten identifiziert (RACE 1, RACE 3, Lambda 12 und C5F).

Fig.13: Detailausschnitte aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* und Mensch (hTC).

Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus einem Proteinsequenzvergleich zwischen den katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* und Mensch (hTC). In den umrandeten Boxen sind die Motive für die Reverse Transkriptase hervorgehoben. Die Ziffern unter den Umrandungen beziehen sich auf die jeweilige Aminosäureposition in der Fig. 2. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Identische Aminosäuren sind fett gedruckt. In der Konsensussequenz für das Reverse Transkriptase (RT consensus)-Motiv steht h für eine hydrophobe Aminosäure und p bezeichnet eine polare Aminosäure. Sind diese Gruppen von Aminosäuren in der Aminosäuresequenz von *Euplotes* und hTC erhalten, sind p bzw. h fettgedruckt. Sehr hoch konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. In RT3 ist die umrandete Box erweitert, um zusätzliche homologe Aminosäuren zu erfassen. Das Telomerase-spezifische Motiv ist in Beispiel 9 beschrieben.

Fig.14: Generierte DNA-Sequenz aus Beispiel 11 (3' Variante) (SEQ ID No. 7). Der nicht zu der in Fig. 1 dargestellten DNA-Sequenz homologe Bereich ist fett hervorgehoben.

Fig.15: hTC Expression in Krebszelllinien und in normalem humanen Gewebe. Abb. A: Auf dem Northern-Blot wurden nach Angaben des Herstellers (Fa. Clontech) etwa 2 µg poly A⁺ RNA aus verschiedenen humanen Zelllinien immobilisiert. Im einzelnen stammte die RNA aus einem Melanom (G361), einem Lungenkarzinom (A549), aus einem Adenokarzinom des Kolons (SW480), aus einem Burkitt Lymphom Raji, aus einer Leukämie Zelllinie (MOLT-4), aus einer chronischen Leukämie Zelllinie (K-

562), aus einem Cervixtumor (HeLa) und aus der Leukämie Zelllinie HL60. Die gekennzeichneten 4,4 kb, 6 kb und 9,5 kb Transkripte sind spezifisch für hTC (vergleiche Beispiel 10). Abb. B: Auf dem Northern-Blot wurden nach Angaben des Herstellers (Fa. Clontech) etwa 2 µg poly A⁺ RNA aus verschiedenen humanen Geweben immobilisiert. Im einzelnen wurde die RNA aus Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und Pankreas isoliert. Ein RNA-Größenstandard ist dargestellt.

Fig.16: Western-Blot Analyse der Kaninchenserum gegen Peptide aus der humanen Telomerase-Aminosäuresequenz (Beispiel 12). Jeweils 20 µl der bakteriellen Lysate aus Beispiel 13 wurden unter Zuhilfenahme der Antiserum aus Beispiel 12 in einem Western-Blot (Ausubel *et al.*, 1987) analysiert. In den Spuren 1, 2, 6 und 7 wurden Lysate aus Bakterien, die das pMALEST-Konstrukt beinhalten, aufgetragen. In den Spuren 3, 4, 8 und 9 wurden Lysate aus Bakterien, die das pMALA1-Konstrukt beinhalten, aufgetragen. In den Spuren 1, 3, 6 und 8 sind Lysate aus nicht mit IPTG (Isopropyl-beta-thiogalaktopyranosid) induzierten Bakterien aufgetragen. In den Spuren 2, 4, 7 und 9 sind Lysate aus mit IPTG induzierten Bakterien aufgetragen. In der Spur 5 wurde ein Standardgrößenmarker (10 kDa Protein-Leiter der Firma Life Technologies, Kat. Nr. 10064-012) aufgetragen. Die 50 kDa- und 120 kDa-Banden sind am Rande der Membranen gekennzeichnet. Die PVDF-Membran in der Abb. A mit den Spuren 1 bis 4 wurde mit Preimmunserum gegen das Peptid B (vergleiche Beispiel 12) inkubiert. Die PVDF-Membran in Abb. B mit den Spuren 6 bis 9 wurde mit Preimmunserum gegen das Peptid C (vergleiche Beispiel 12) inkubiert. Die PVDF-Membran in der Abb. B mit den Spuren 1 bis 4 wurde mit Immunserum gegen das Peptid B (vergleiche Beispiel 12) inkubiert. Die PVDF-Membran in Abb. B mit den Spuren 6 bis 9 wurde mit Immunserum gegen das Peptid C (vergleiche Beispiel 12) inkubiert.

Fig.17: Autoradiogramm von ³⁵S-markiertem, *in vitro* translatiertem Protein. In der Spur 1 wurde das vollständige *in vitro* translatierte hTC aufgetragen (vergleiche Beispiel 15). In der Spur 2 wurde eine C-terminal verkürzte Version von pHTC aufgetragen. Die Spur 3 zeigt eine vom Hersteller (vergleiche Beispiel 15) gelieferte

Positivkontrolle für die *in vitro* Translation. Zur Abschätzung der Proteingrößen ist auf der rechten Seite ein Proteingrößenstandard gekennzeichnet.

Fig. 18: Autoradiogramm von ^{32}P -markierten Produkten aus dem TRAP-Assay (vergleiche Beispiel 15). In den Spuren 1 und 2 wurde als Negativkontrolle ein TRAP-Assay Ansatz ohne Zugabe von Enzym oder Protein aufgetragen. In den Spuren 3 und 4 wurde als Positivkontrolle ein TRAP-Assay-Ansatz mit partiell aufgereinigter humaner Telomerase aus HeLa-Zellen aufgetragen. In den Spuren 5 und 6 wurde ein TRAP-Assay-Ansatz mit *in vitro* translatiertem phTC unverdünnt aufgetragen. In den Spuren 7 und 8 wurde ein TRAP-Assay Ansatz mit *in vitro* translatiertem phTC in einer 1:4 Verdünnung aufgetragen. In den Spuren 9 und 10 wurde ein TRAP-Assay Ansatz mit *in vitro* translatiertem phTC in einer 1:16 Verdünnung aufgetragen. In den Spuren 11 und 12 wurde als Negativkontrolle ein TRAP-Assay Ansatz mit *in vitro* translaterter Luziferase aufgetragen.

Fig. 19: Autoradiogramm von ^{32}P -markierten Produkten aus dem direkten Telomerase Assay (vergleiche Beispiel 15). In der Spur 1 wurde ein radioaktiv markierter 10 bp-Marker aufgetragen. In der Spur 2 wurde ein 5' radioaktiv markiertes Telomeroligonukleotid ([TTAGGG]₃) aufgetragen. Bei der Spur 3 handelt es sich um eine leere Spur. In der Spur 4 wurde als Positivkontrolle partiell aufgereinigte humane Telomerase aus HeLa-Zellen im direkten Assay verwendet und das Syntheseprodukt aufgetragen. In der Spur 5 wurde das *in vitro* translatierte phTC aus Beispiel 15 im direkten Assay verwendet und das Syntheseprodukt aufgetragen.

Beispiele

Beispiel 1

5 Es wird heute angenommen, daß weniger als 5 % des humanen Genoms tatsächlich transkribiert und in Protein translatiert werden. Durch die gezielte Untersuchung dieser kodierenden Genomanteile könnten bereits vor der kompletten Sequenzierung des Genoms wichtige Informationen über die 60 000 - 70 000 Gene in einer humanen Zelle gewonnen werden. Die Automatisierung der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzieretechnologie in den
10 letzten 10 bis 15 Jahren ermöglichte es, viele cDNAs aus Plasmid-cDNA-Bibliotheken unterschiedlichsten Ursprungs zu sammeln und das jeweilige 5'- bzw. 3'-Ende zu sequenzieren. Diese typischerweise 300 bis 400 bp kurzen DNA-Sequenzen werden „Expressed Sequence Tags“ oder kurz ESTs genannt und sind in verschiedenen spezialisierten Datenbanken zusammengefaßt. Der EST-Ansatz wurde zuerst von Okubo *et al.* (1992) beschrieben und von Adams *et al.* (1992) auf einen größeren Maßstab
15 übertragen. Gegenwärtig sind etwa 50 000 Gene aus humanen Zellen teilweise sequenziert und als EST-Eintragung dokumentiert.

Durch den Vergleich mit DNA- und Aminosäuresequenzen bekannter Gene können verwandte, aber bislang unbekannte Gene in diesen EST-Datenbanken identifiziert werden
20 (Gerhold and Caskey, 1996). Ein Suchalgorithmus, der sich hierfür besonders bewährt hat, ist das tBLASTn (Altschul *et al.*, 1990). Dieser Algorithmus translatiert jede DNA-Sequenz in der EST-Datenbank in alle sechs möglichen Leserahmen und vergleicht diese Aminosäuresequenzen mit der bekannten Proteinsequenz.

25 Mit der kürzlich publizierten Proteinsequenz für die katalytische Telomerase-Untereinheit aus *Euplotes aediculatus*, p123 (Lingner *et al.*, 1997), wurde die EST-Datenbank am National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchsucht. Als Resultat wurde ein humaner EST mit der Accession Nummer AA281296 identifiziert, der im Leserahmen +1
30 eine signifikante Homologie zu p123 aufweist. Diese Aminosäuresequenz mit dem Leserahmen +1 wird im folgenden als EST₊₁ bezeichnet.

Die Homologie zwischen p123 und dem EST₊1 ist am auffälligsten in zwei Sequenzbereichen, die durch 30 Aminosäuren getrennt sind. Der längere Sequenzbereich, der sich bei p123 von Aminosäure 438 bis 484 erstreckt, ist zu 38% identisch zu dem korrespondierenden Bereich im EST₊1. Werden auch ähnliche Aminosäuren berücksichtigt, liegt die Übereinstimmung sogar bei 59%. Der zweite Homologieblock erstreckt sich im p123-Protein von Aminosäure 513 bis 530 und weist eine 44%ige Identität zu dem entsprechenden Sequenzabschnitt im identifizierten EST₊1 auf. Unter Berücksichtigung von Aminosäureresten mit ähnlichen Eigenschaften findet sich eine Überstimmung von 61%.

Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung einer BLAST-Suche ist der Wert P (Probability). P gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein spezifisches Segmentpaar auch in einer BLAST-Suche mit einer Zufallssequenz gefunden würde und bewegt sich numerisch zwischen 0 (Resultat hoch signifikant) und 1 (Ergebnis ohne Bedeutung). So verlief z.B. der Vergleich des p123 Äquivalents aus Hefe (est2p) mit der NCBI-EST-Datenbank negativ: Der gefundene EST hatte eine Wahrscheinlichkeit von P=1 (Tab. 1). Dagegen weist das humane Telomerase- assoziierte Protein 1 (hTP1), das in einer der Allgemeinheit nicht zugänglichen EST-Datenbank gefunden wurde (Harrington *et al.*, 1997), eine Wahrscheinlichkeit von P=0.004 auf.

| bekanntes Gen (Spezies) | P | identifiziertes Gen | Ursprung der cDNA Bibliothek |
|---|----------------------|--|------------------------------|
| est2p (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | 0.999 | Ratten EST | Niere |
| p80 (<i>Tetrahymena thermophila</i>) | 0.004 | hTP1 (Harrington <i>et al.</i> , 1997) | Krypten des Darmepithels |
| p123 (<i>Euplotes aediculatus</i>) | $3.5 \cdot 10^{-06}$ | AA281296 | Keimzentren der Tonsillen |

Tab. 1: Vergleich dreier tBlastn-Suchläufe mit verschiedenen bekannten Genen.

Der durch den Vergleich mit p123 identifizierte humane EST AA281296 hat eine Wahrscheinlichkeit von $P=3.5 \times 10^{-06}$.

Diese Daten legen nahe, daß der identifizierte EST aller Wahrscheinlichkeit nach für ein Fragment der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase kodiert. Daher wird das korrespondierende Gen im folgenden mit hTC (human Telomerase, catalytic) und das abgeleitete Protein mit phTC abgekürzt.

Beispiel 2

Der durch den Vergleich mit p123 identifizierte EST wurde am 2. April 1997 in die EST-Datenbank eingespeist und ist in keiner Zeitschrift publiziert. Die cDNA-Bibliothek, in welcher dieser EST-Klon vorliegt, wurde laut Angaben des National Center for Biotechnology Information wie folgt hergestellt:

Nach Präparation der mRNA aus den Keimzentren der Tonsillen wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt und die doppelsträngigen cDNA-Fragmente gerichtet über die Restriktionsenzymchnittstellen Not I und Eco RI in den Vektor pT7T3D-Pac kloniert.

Die Sequenzierung der in die EST-Datenbank eingespeisten 389 bp erfolgte über den -28m13 rev2-Primer der Firma Amersham (DNA-Sequenz siehe Fig. 1 Position 1685 bis 2073).

Unter Verwendung der Lasergene Programmsoftware (Dnastar Inc.) wurde die DNA-Sequenz von EST AA281296 entsprechend des humanen genetischen Codes translatiert. Die resultierende Aminosäuresequenz (EST₁) entspricht der Position 542 bis 670 in Fig. 2.

Die abgeleitete Proteinsequenz von EST₁ setzt sich aus 129 Aminosäuren zusammen, darunter 27 basische, 11 saure, 51 hydrophobe und 28 polare Aminosäurereste.

Der in Beispiel 1 identifizierte EST (AA 281296) wurde kommerziell von der Research Genetics, Inc. (Huntsville) in Form eines in *E. coli* transformierten Plasmids erworben und experimentiell analysiert:

Wie in dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel der Fig. 3 gezeigt, wird nach Restriktionsverdau der hergestellten Plasmid DNA vom EST AA 281296 ein etwa 2,2 kb großes Fragment aus dem Vektor pT7T3D freigesetzt. Anhand einer parallel durchgeführten Polymeraseketten- (PCR) -Reaktion mit spezifischen internen Primern wurde der EST AA281296 überprüft. : Die Länge der erwarteten PCR Produkte liegt bei 325 und 380 bp und stimmt mit der Länge der experimentell gefundenen Fragmente überein (vergl. Spur 4 und 5 in Fig.3). Damit konnte gezeigt werden, daß der vom Research Genetics, Int. (Huntsville) zugesandte E.coli-Klon den identifizierten EST als Plasmid beinhaltet.

Nach DNA-Präparation wurden die insgesamt 2176 bp des Inserts durch Doppelstrangsequenzierung identifiziert. Ein Sequenzvergleich des Klons AA281296 mit der DNA-Sequenz des C5F-Fragments (vergleiche Beispiel 7) ergab, daß eine 182 bp Deletion vorliegt (Position 2352 bis 2533, Fig. 1) und sich somit der offene Leserahmen in diesem Bereich verschiebt. Zusammenfassend setzt sich die DNA-Sequenz von Klon AA281296 somit aus den Sequenzinformationen der Fig. 1 (Position 1685 bis 2351 und Position 2534 bis 4042) zusammen.

Beispiel 3

Im tBLASTn Vergleich werden nur die Bereiche mit den höchsten Übereinstimmung zwischen p123 und EST₁ identifiziert (Aminosäuren 438-530, in p123), wogegen die dazwischenliegenden Aminosäuren nicht berücksichtigt werden. Um Aussagen über die Verwandtschaft der Proteinsequenzen über einen größeren Bereich (Aminosäuren 437-554, in p123) zu treffen, wurde ein „Lipman-Pearson Proteinvergleich“ durchgeführt (siehe Fig. 4). Hierbei wurden 34% identische Aminosäuren bzw. 59% Aminosäuren, die entweder identisch oder biochemisch ähnlich sind, gefunden. Dieses Ergebnis zeigt, daß sich auch außerhalb der mit dem tBLASTn gefundenen Homologiebereiche die Verwandtschaft zwischen diesen Proteinen fortsetzt.

Wie kürzlich berichtet (Lingner *et al.*, 1997), sind p123 aus *Euplotes aediculatus* und est2p aus *Saccharomyces cerevisiae* zueinander homolog. Um den Grad der Verwandtschaft

zwischen p123 und est2p ins Verhältnis zu der hier beschriebenen Homologie zwischen p123 und EST₊1 zu stellen, wurde die oben beschriebene Region von p123 (Aminosäuren 437-554) mit Hilfe des Lipman-Pearson Proteinvergleichs unter Verwendung identischer Parameter auch mit est2p verglichen. Dabei zeigte sich, daß p123 und est2p in diesem ausgewählten Bereich zu 21% identisch sind bzw. 22% identische Aminosäuren oder biochemisch ähnliche Aminosäurereste aufweisen (siehe Fig. 5). Demnach ist die Homologie zwischen EST₊1 und dem p123 von *Euplotes* signifikant höher als zwischen die p123 und est2p.

10 **Beispiel 4**

Die Homologie von p123 zu EST₊1 und est2p legt die Schlußfolgerung nahe, daß alle 3 Proteine zur gleichen Proteinfamilie gehören. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde est2p unter den in Beispiel 3 erwähnten Bedingungen mit EST₊1 verglichen (siehe Fig. 6). Dabei zeigte sich, daß EST₊1 20% Identität zu est2p hat, also eine vergleichbare Homologie wie p123 zu est2p aufweist. Diese vergleichsweise geringe Übereinstimmung bestätigt auch den Befund, daß in der tBLASTn-Suche mit est2p kein signifikanter EST identifiziert wurde (siehe Beispiel 1).

20 **Beispiel 5**

Um für die Proteinfamilie der katalytischen Telomerase-Untereinheiten aus verschiedenen Spezies wichtige, unter Umständen funktionelle Domänen, zu identifizieren, wurde ein Computervergleich mit p123, est2p und phTC durchgeführt (siehe Fig. 7). Bei dieser Analyse fallen insbesondere zwei Bereiche auf, die in allen drei Proteinen enthalten sind (siehe Fig. 7). Dem Bereich, der bei p123 den Aminosäuren 447 bis 460 entspricht (Fig. 13, Telomerase Motiv) kann gegenwärtig keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Eine Motiv-Suche mit dem „Wisconsin Sequence Analysis Package“ von der „Genetics Computer Group“ (GCG) und eine Suche in einer Protein-Datenbank (Swissprot, Ausgabe vom 8.6.1997) ergaben keine signifikanten Erkenntnisse.

5 Dagegen weist ein zweiter, zwischen p123, est2p und phTC homologer Bereich, der bei p123 den Aminosäuren 512-526 entspricht, ein Konsensus-Motiv für eine Reverse Transkriptase (RT) auf (Fig. 7 und 13). Lingner *et al.* (1997) konnten zeigen, daß p123/est2p insgesamt 6 solcher RT-Motive enthalten, die für die katalytische Funktion von p123/est2p essentiell sind. Wie in Fig. 7 und 13 dargestellt, sind in der untersuchten Sequenz von phTC auch zwei solcher RT-Motive konserviert. Hierbei handelt es sich um die RT-Motive, welche bei p123/est2p am weitesten N-terminal lokalisiert sind (Lingner *et al.*, 1997).

10 Die Primärsequenzen von Reversen Transkriptasen sind stark divergent; nur wenige Aminosäuren sind innerhalb eines separaten Motivs vollständig konserviert (Poch *et al.*, 1989 und Xiong and Eickbush, 1990). Außerdem unterscheiden sich Reverse Transkriptasen, die von Retroviren oder Long Terminal Repeat (LTR) Retrotransposons kodiert werden, durch verschiedene Abstände zwischen den konservierten RT-Motiven von solchen Reversen
15 Transkriptasen, die von Nicht-LTR Retrotransposons oder der Gruppe II Introns kodiert werden (Xiong and Eickbush, 1990). Entsprechend des Aufbaus ihrer RT-Motive sind p123, est2p und phTC letzterer RT-Gruppe zuzuordnen. Interessanterweise entsprechen dabei die Konsensussequenzen der RT-Motive in phTC am genauesten dem postulierten RT-Konsensus-Motiv: Von acht Aminosäureresten innerhalb der zwei RT-Motive sind bei
20 phTC 6, bei p123 und est2p hingegen nur 5 Aminosäuren zu finden (Fig. 7 und 13). Auffällig sind hierbei insbesondere die hydrophoben Aminosäuren wie Leucin und Isoleucin sowie die Aminosäuren Lysin und Arginin in bestimmten Positionen (Fig. 7 und 13).

25 Zusammenfassend konnte hiermit auf deskriptiver Ebene gezeigt werden, daß der aufgrund seiner Homologie zu p123 identifizierte Klon AA281296 ein Fragment der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase darstellt.

Beispiel 6

30 Zur Klonierung des 5'-Endes der hTC-cDNA wurden zusätzlich zu dem in Beispiel 8 aufgeführten Homologiescreening drei aufeinanderfolgende RACE (rapid amplification of cDNA ends)-Reaktionen durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA

(Fa. Clontech) aus der humanen Leukämiezelllinie K562 bzw. aus humanem Testisgewebe eingesetzt. Nachfolgend ist die Durchführung sowie das Ergebnis der einzelnen RACE-Runden beschrieben.

- 5 Darüberhinaus wurden die Sequenzinformationen der RACE-Runden genutzt, um per PCR die Einzelfragmente als einen zusammenhängenden cDNA-Klon zu amplifizieren.

RACE-Runde 1:

- 10 In einem Endvolumen von 50 µl wurden 5 µl K562 Marathon-Ready cDNA (Fa. Clontech, Katalognummer 7441-1) mit 10 pmol dNTP-Mix versetzt und in 1 x Klen Taq PCR-Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq Polymerase Mix (Fa. Clontech) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Als Primer wurden 10 pmol des internen genspezifischen Primers GSP2 (5'-GCAACTTGCTCCAGACACTCTTCCGG-3') aus dem 5'-Bereich des hTC-
- 15 EST-Klons sowie 10 pmol des Marathon Adaptor Primers AP1 (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; Fa. Clontech) zugefügt. Die PCR wurde in 4 Schritten durchgeführt. Nach einer einminütigen Denaturierung bei 94°C wurde über 5 Zyklen für 30 sec bei 94°C denaturiert und anschließend für 4 min bei 72°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert. Es folgten 5 Zyklen, bei denen für 30 sec die
- 20 DNA bei 94°C denaturiert wurde, die anschließende Primerverlängerung aber für 4 min bei 70°C erfolgte. Abschließend wurden dann 22 Zyklen durchgeführt, bei denen nach den 30 sec DNA-Denaturierung die Primeranlagerung und Kettenverlängerung für 4 min bei 68°C stattfand.
- 25 Im Anschluß an diese PCR wurde das PCR-Produkt 1:50 verdünnt. Fünf µl dieser Verdünnung wurden in einer zweiten „nested“ PCR zusammen mit 10 pmol dNTP-Mix in 1 x Klen Taq PCR-Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq Polymerase-Mix sowie 10 pmol des Primers GSP2 und 10 pmol des „nested“ Marathon Adaptor Primers AP2 (5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'; Fa. Clontech) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen
- 30 entsprachen den in der ersten PCR gewählten Parametern. Als einzige Ausnahme wurden im letzten PCR-Schritt statt 22 Zyklen nur 16 Zyklen gewählt.

Als Produkt dieser Nested-RACE-PCR wurde ein 1153 bp langes DNA-Fragment erhalten. Dieses wurde in den TA-Cloning Vektor pCR2.1 der Fa. InVitrogen kloniert und vollständig doppelsträngig sequenziert (Fig. 8 und SEQ ID No. 3).

5 Die Nukleotide 974 bis 1153 repräsentieren die in Fig. 1 dargestellte Nukleotidregion 1629 bis 1808 der hTC-cDNA. Bei dem von bp 1-973 reichenden Nukleotidbereich, der keine Homologie zu der in Fig. 1 gezeigten hTC-cDNA-Sequenz aufweist, handelt es sich um Intronsequenzen des hTC-Gens (Daten nicht gezeigt). Eine 3'-Splice-Konsensussequenz ist am Exon-Intron-Übergang zu finden. Die Präsenz von Intronsequenzen könnte auf
10 unvollständig gespligte mRNA als Ausgangssubstanz für die cDNA-Synthese zurückzuführen sein. Auch genomische DNA-Kontaminationen in der cDNA könnten das Auffinden von Intronsequenzen erklären.

RACE-Runde 2:

15 Basierend auf den Sequenzdaten der ersten RACE-Runde wurde eine zweite RACE mit dem genspezifischen Primer GSP5 aus der 5'-Region von RACE-Produkt 1 (5'-GGCAGTGACCAGGAGGCAACGAGAGG-3') sowie dem AP1-Primer durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA aus humanem Testis (Fa. Clontech; Katalognummer 7414-1) verwendet. Es wurden gleiche PCR-Bedingungen wie bei der 1. PCR in RACE-Runde 1 gewählt. Auch in RACE-Runde 2 wurde an die 1. PCR eine 2. „nested“ PCR mit verdünntem PCR-Produkt als cDNA-Quelle angeschlossen. Als „nested“
20 PCR-Primer wurden der genspezifische Primer GSP6 aus der 5'-Region von RACE-Produkt 1 (5'-GGCACACTCGGCAGGAAACGCACATGG-3') sowie der AP2-Primer genutzt. Die Bedingungen entsprachen den Parametern der Nested-PCR aus RACE-Runde
25 1.

Das 412 bp lange PCR-Produkt der Nested-PCR aus RACE-Runde 2 wurde in den TA-Cloning Vektor pCRII-Topo der Fa. Invitrogen kloniert und vollständig sequenziert (Fig. 9
30 und SEQ ID No. 4). Der Sequenzabschnitt von bp 267 bis bp 412 ist komplett homolog zu dem 5'-Bereich des Produktes aus RACE 1. Die Region von bp 1 bis bp 266 verlängert

RACE-Produkt 1 am 5'-Ende. Bei diesem RACE-Produkt 2 handelt es sich wahrscheinlich komplett um einen Intronbereich des hTC-Gens (Daten nicht gezeigt).

RACE-Runde 3:

5 Eine dritte RACE-Runde führte zur Identifizierung von weiter 5'-gelegenen hTC-cDNA-Regionen. Ausgehend von den Sequenzergebnissen der RACE-Runde 2 wurde ein genspezifischer Primer GSP9 (5'-CCTCCTCTGTTCAGTCTCTGGCC-3') aus dem 5'-Bereich des RACE-Produkts 2 gewählt und zusammen mit dem AP1-Primer und Marathon-Ready cDNA aus humanem Testis (Fa. Clontech) in einer neuen RACE eingesetzt. Die
10 RACE-Bedingungen glichen denen der 1. PCR in RACE 1 und 2. In der nachfolgenden „nested“ RACE, die, entsprechend der „nested“-RACE in Runde 1 und 2, mit dem genspezifischen Primer GSP 10 aus dem 5'-Bereich von RACE-Produkt 2 (5'-CGTAAGTTTATGCAAACTGGACAGG-3') und AP2 erfolgte, wurde ein 1012 bp langes
15 Fragment (Fig. 10 und SEQ ID No. 5) amplifiziert und in den TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO kloniert. Die nachfolgende Sequenzierung zeigte, daß die 3'-Region dieses RACE-Fragments (bp 817 - bp 1012) offensichtlich noch Intronsequenz des hTC-Gens darstellt. Komplette homolog zur 5'-Region von RACE-Produkt 2 ist der Bereich von bp 889-1012. Dagegen ist der 5'-Bereich dieses Fragments von bp 1-bp 816 identisch mit der in Fig. 1
20 gezeigten Region von bp 814 - bp 1629 der hTC-cDNA. Eine potentielle 5'-Splice-Konsensussequenz ist am Exon-Intron-Übergang zu finden.

Beispiel 7

25 Zur Klonierung eines zusammenhängenden Fragments aus den Sequenzinformationen von RACE 2 und dem Klon AA281296 wurde eine PCR durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA aus humanem Testis (Fa. Clontech; Katalognummer 7414-1) verwendet. Der PCR Ansatz erfolgte wie unter RACE 1 (vergleiche Beispiel 6) beschrieben, allerdings mit den Primern C5F (5'-CGAGTGGACACGGTGATCTCTGCC-3') aus der 5'
30 Region von RACE 2 und dem Primer C3B (5'-GCACACCTTTGGTCACTCCAAATTCC-3') aus der 3' Region vom Klon AA281296. Die PCR wurde in 2 Schritten durchgeführt. Nach einer einminütigen Denaturierung bei 94°C wurde über 36 Zyklen für 30 sec bei 94°C

denaturiert und anschließend für 4 min bei 68°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert.

Als Produkt dieser PCR wurde ein 2486 bp langes DNA-Fragment, im folgenden als C5F-Fragment bezeichnet, erhalten. Dieses wurde in den TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO der Fa. Invitrogen kloniert und vollständig doppelsträngig sequenziert. Ein Sequenzvergleich von dem C5F-Fragment mit DNA-Sequenz vom Klon AA281296 ergab, daß zwischen dem RT-Motiv 3 und RT-Motiv 4 eine 182 bp lange in frame Insertion vorliegt (Position 2352 bis 2533, Fig. 1). Ein weiterer Vergleich der DNA vom C5F-Fragment mit den Sequenzen der drei RACE-Runden machte deutlich, daß am 3' Ende von C5F ein bereits in RACE 2 identifiziertes Intron vorliegt. Eine 3'-Splice-Konsensussequenz ist am Exon-Intron-Übergang zu finden. Zusammenfassend setzt sich die DNA-Sequenz vom C5F-Fragment somit aus den Sequenzinformationen der Fig. 9 (Position 64 bis 278) und den Sequenzdaten der Fig. 1 (Position 1636 bis 3908) zusammen.

Beispiel 8

Zur Klonierung des 5'-Endes der hTC-cDNA wurden zusätzlich zu dem in Beispiel 6 aufgeführten RACE-Protokoll ein Homologiescreening (Ausubel *et al.*, 1987) durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde eine humane Erythroleukemia 5'-Stretch Plus cDNA Bibliothek (Fa. Clontech, Kat. Nr. HL5016b) aus der humanen Leukämiezelllinie K562 verwendet. Etwa 3×10^6 Pfu dieser random und oligo dT geprimten Bibliothek wurden wie bei Ausubel *et al.*, (1987) ausplattiert und zum Screening eingesetzt. Als Probe wurde ein 719 bp langes (Position 1685 bis 2404, entsprechend der Fig. 1) radioaktiv markiertes hTC-DNA-Fragment benutzt.

Von 20 putativ positiven λ Klonen konnte nach einem Rescreening mit der gleichen hTC-Sonde der λ Klon 12 als positiv verifiziert werden. Nach Plaqueaufreinigung und λ DNA-Präparation (Ausubel *et al.*, 1987) wurde das 4kb Insert in den Vektor pBluescript umklont und durchsequenziert (Fig. 11 und SEQ ID No. 6).

Ein Vergleich der λ Klon 12-Sequenz mit den Sequenzen der RACE-Klone und der DNA-Sequenz vom Klon AA281296 ergab, daß dieser im Homologie Screening identifizierte Klon für einen 5' Teil der hTC-cDNA kodiert und ein putatives ATG-Startcodon in Position 63 entsprechend der Fig. 1 aufweist. 5' von diesem ATG liegt kein Stopcodon im gleichen Leserahmen vor. Weitere Sequenzanalysen machen deutlich, daß der λ Klon 12 von Position 1656 bis 2004 wahrscheinlich ein Intron enthält. Sehr gut konservierte 5' und 3' Splicestellen belegen diese Hypothese. Die für die hTC-cDNA kodierende Sequenz setzt sich dann von Position 2005 bis Position 2382 fort. Die Sequenz von 2383 bis zum 3' Ende vom λ Klon 12 weist einen auffälligen offenen Leserahmen in Leseraster -4 auf. Eine bioinformatische Analyse der entsprechenden DNA-Sequenz zeigte, daß dieser Leserahmen über etwa 400 bp identisch zu diversen ESTs ist, die in keinem Zusammenhang zur hTC-cDNA stehen. Somit handelt es sich bei dem λ Klon 12 um einen chimären Klon, der sich im wesentlichen aus dem 5' Ende der hTC cDNA und einem weiteren cDNA-Klon unbekannter Funktion zusammensetzt.

Eine zusammenfassende schematische Darstellung mit der relativen Orientierung der RACE-Produkte und des Homologiescreenings ist in Fig. 12 dargestellt. Die vollständige Sequenz der hTC-cDNA (Fig. 1) wurde aus dem λ Klon 12 (Position 21 bis 1655 entsprechend der Fig. 11), dem PCR-Produkt C5F (Position 1636 bis 3908 entsprechend der Fig. 1) und dem EST AA281296 (Position 3909 bis 4042 entsprechend der Fig. 1) zusammengesetzt.

Beispiel 9

Durch einen Vergleich der phTC-Proteinsequenz (Fig. 2 und SEQ ID No. 2) mit einer Konsensussequenz von Reversen Transkriptasen (Poch *et al.*, 1989, Xiong and Eickbush, 1990) wurden insgesamt sieben Motive für Reverse Transkriptasen (RT-Motive) identifiziert (Fig. 13). Innerhalb dieser Motive sind einige Aminosäuren nicht nur zwischen der RT-Konsensussequenz und dem phTC, sondern auch im Vergleich zu dem Telomeraseprotein aus *Euplotes* hoch konserviert. So sind z.B. in RT-Motiv 5 zwei Asparaginsäuren (Position 868 und 869 in Fig. 2) völlig konserviert (Fig. 13). Das aus anderen Reverse

Transkriptasen abgeleitete RT-Motiv 7 (Poch *et al.*, 1989, Xiong and Eickbush, 1990) wurde nur in der humanen katalytischen Telomeraseuntereinheit aufgezeigt, nicht in dem *Euplotes*-Protein (Fig. 13).

5 Auffällig sind weiterhin Strukturmerkmale, die sich nur in den Telomeraseproteinen, nicht jedoch in anderen Reverse Transkriptasen aufzeigen lassen. Das Telomerase Motiv (Position 553 und 565 in Fig. 2) ist eine für diese Proteinfamilie spezifische Struktur, da es in keinem bisher bekannten Protein vorkommt. Ein weiteres nur in den katalytischen Telomeraseproteinen identifiziertes Merkmal ist der Abstand zwischen den RT-Motiven 3
10 und 4, der mit 107 Aminosäuren deutlich größer ist als in anderen RTs. Diese Besonderheiten erlauben die Schlußfolgerung, daß die katalytischen Untereinheiten der Telomerasen aus verschiedenen Spezies wahrscheinlich eine eigene Untergruppe der RNA-abhängigen DNA-Polymerasen darstellt.

15 **Beispiel 10**

Die Expression der Telomerase RNA-Untereinheit (hTR) korreliert nicht mit der Telomeraseaktivität, sondern wird ubiquitär beobachtet (Feng *et al.*, 1995). Somit stellt sich die Frage, ob die Ausprägung der katalytischen Telomerase-Untereinheit mit der
20 Telomeraseaktivität einhergeht.

Um das hTR-Expressionslevel zu analysieren, wurden Northern Blot-Experimente (Ausubel *et al.*, 1987) durchgeführt. Die kommerziell erhältlichen Northern Blots waren entweder mit einer Reihe von RNA-Präparationen aus normalem, humanem Gewebe (Fa. Clontech;
25 Katalognummer 7760-1) oder mit RNA-Proben aus humanen Krebszelllinien (Fa. Clontech; Katalognummer 7757-1) bestückt. Als Probe wurde ein 719 bp langes (Position 1685 bis 2404, entsprechend der Fig.1) radioaktiv markiertes hTR-DNA-Fragment benutzt. Die Inkubation der Membranen mit der Probe erfolgte nach Angaben des Herstellers (Fa. Clontech).

30 In den acht getesteten humanen Zelllinien (3 Leukämiezelllinien, 3 Carcinomzelllinien, ein Melanom und ein Lymphom) wurden zwei RNA-Haupttranskripte in der Größe von etwa

9,5 kb und 4,4 kb und ein RNA-Nebentranskript von etwa 6 kb nachgewiesen, die mit der Probe kreuzhybridisieren (Fig. 15, Abb. A). Die hTC mRNA wurde im Vergleich am stärksten in den Leukämie Zelllinien K-562 und HL-60 exprimiert (Fig. 15, Abb. A). Im Gegensatz dazu war das hTC-Transkript in den getesteten normalen Geweben (Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas) nicht nachzuweisen (Fig. 15, Abb. B). Diese Beobachtung ist nicht überraschend, da in diesen Geweben auch keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden konnte (Kim *et al.*, 1994).

Diese Daten deuten darauf hin, daß die Induktion der hTC Expression für die Aktivierung der Telomerase während der Tumorentstehung eine wesentliche Rolle spielt.

Beispiel 11

Bei der PCR-Amplifikation der hTC-cDNA-Fragmente aus verschiedenen cDNA-Banken (Marathon Ready cDNA der Fa. Clontech aus der humanen Leukämiezelllinie K562 und aus humanem Testis sowie cDNA aus der humanen prämyeloischen Leukämiezelllinie HL60) wurden stets mehrere PCR-Produkte erhalten, die in ihrer Größe minimal voneinander abwichen. Um die Unterschiede zwischen den verschiedenen hTC-PCR-Produkten aufzuklären, wurde mit den Primern C5A (5'-CCGGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTGC-3') und C3B (5'-GCACACCTTTGGTCACTCCAAATTCC-) ein von bp 1783 bis bp 3901 reichendes Fragment der in Fig. 1 dargestellten hTC-cDNA amplifiziert. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA aus K562-Leukämiezellen (Fa. Clontech; Katalognummer 7441-1) verwendet (PCR1 und 2). In einer dritten PCR wurde mit den Primern GSP1vor (5'-GGCTGATGAGTGTGTACGTCGTCGAG-3') und HTRT3A (5'-GGGTGGCCATCAGTCCAGGATGG-3') ein hTC-Fragment von bp 1695 bis bp 3463 der hTC-cDNA in Fig. 1 aus HL60-cDNA amplifiziert.

Nachfolgend sind die Bedingungen der 3 PCR-Reaktionen beschrieben:

In der ersten PCR wurden in einem Endvolumen von 50 µl 5 µl K562 Marathon-Ready cDNA mit 10 pmol dNTP-Mix versetzt und in 1 x Klen Taq PCR-Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq Polymerase Mix (Fa. Clontech) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Je

10 pmol der Primer C5A und C5B wurden zugefügt. Die PCR wurde in 3 Schritten durchgeführt. An eine einminütige Denaturierung bei 94°C schlossen sich 35 PCR-Zyklen an, in denen die DNA zunächst für 30 sec bei 94°C denaturiert wurde und anschließend für 4 min bei 68°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert wurde. Zum Abschluß
5 folgte für 10 min eine Kettenverlängerung bei 68°C. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in den TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO der Fa. InVitrogen kloniert.

In einer zweiten PCR wurden 5 µl K562 Marathon-Ready cDNA mit je 10 pmol der Primer C5A und C3B, 10 pmol dNTP-Mix und 2 U Taq-DNA-Polymerase (Fa. Gibco-BRL)
10 versetzt und in einem Endvolumen von 50 µl eine PCR-Reaktion in 1x PCR-Puffer der Fa. Perkin Elmer durchgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte in 3 Schritten. Zunächst wurde die DNA für 3 min bei 94°C denaturiert. Es folgten 34 Zyklen, bei denen aufeinanderfolgend die DNA für 45 sec bei 94°C denaturiert wurde, anschließend für 1 min bei 68°C die Primeranlagerung erfolgte und danach für 3 min bei 72°C die DNA-Kette verlängert wurde.
15 Im letzten PCR-Schritt wurde für 10 min bei 72°C eine abschließende Kettenverlängerung durchgeführt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in den TA-Cloning Vektor pCR2.1 der Fa. InVitrogen kloniert.

Für die dritte PCR wurde zunächst mit dem cDNA-Synthese-Kit der Fa. Boehringer Mannheim aus 2 µg DNaseI-behandelter Poly A-RNA der humanen prämyeloischen Zelllinie HL60 eine cDNA-Synthese entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt. In einem Endvolumen von 50 µl wurde anschließend 1 µl dieser HL60-cDNA mit je 10 pmol der Primer GSP1vor und HTRT3A sowie 10 pmol dNTP-Mix gemischt und nach Zusatz von 1,25 µl DMSO in 1 x Klen Taq PCR-Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq
25 Polymerase Mix (Fa. Clontech) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die PCR-Reaktion verlief in 3 Schritten. Nach einer Denaturierung für 3 min bei 94°C wurde über 37 Zyklen die DNA zunächst für 1 min bei 94°C denaturiert und anschließend für 4 min bei 68°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert. Abschließend erfolgte noch eine Inkubation für 10 min bei 68°C. Die PCR-Produkte wurden in den TA-Cloning Vektor pCR 2.1-TOPO
30 kloniert.

Die vollständige Doppelstrangsequenzierung der aus PCR 1 und 2 klonierten hTC-cDNA-Fragmente sowie die partielle Sequenzierung der aus PCR 3 erhaltenen hTC-cDNA-Fragmente zeigte, daß zusätzlich zu der in Fig. 1 dargestellten hTC-cDNA 4 Varianten dieser cDNA in humanen Zellen existieren:

5

Variante 1 der humanen hTC-cDNA zeichnet sich durch eine 182 bp lange Deletion der Nukleotide 2345 bis 2526 aus. Durch diese Deletion kommt es zu einer Verschiebung im ORF und es wird ein verkürztes hTC-Protein abgelesen, dem die RT-Motive 4 bis 7 fehlen.

10

Variante 2 der humanen hTC-cDNA weist eine 36 bp lange Deletion der Nukleotide 2184 bis 2219 auf. Durch diese Deletion geht das RT-Motiv 3 verloren. Der Leserahmen bleibt jedoch erhalten und es wird ein Protein hergestellt, dem selektiv das RT-Motiv 3 fehlt.

15

Variante 3 der humanen hTC-cDNA stellt eine Kombination der Varianten 1 und 2 dar. Sie weist sowohl eine Deletion der bp 2184 bis 2219 als auch der bp 2345 bis 2526 auf.

20

Variante 4 der humanen hTC-cDNA zeichnet sich durch den Verlust des Nukleotidbereichs von bp 3219 bis 3842 aus. Diese fehlende Sequenz ist durch eine nicht zu hTC homologe Sequenz ersetzt. Ab bp 3843 ist die Sequenz wieder völlig identisch zu der in Fig. 1 dargestellten hTC-Sequenz. Die Sequenz der Variante 4 ist in Fig. 14 dargestellt. Entsprechend des gewählten 5'-Primers beginnt sie mit bp 1783 der in Fig. 1 dargestellten hTC-cDNA. Der nicht-homologe Bereich ist fett hervorgehoben und stimmt von Position 3219 bis Position 3451 (Fig. 14 und SEQ ID No. 7) auf DNA Ebene zu 98,7% mit einem EST (Accession Nr. AA299878) aus einem humanen Uterustumor überein.

25

Beispiel 12

30

Zur Gewinnung von Antiseren mit Spezifität für die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase wurde die vorhandene Nukleotidsequenz (Fig. 1) in eine Aminosäuresequenz übersetzt (Fig. 2). Mit Hilfe eines Programms zur Sekundärstrukturvorhersage (PROTEAN, aus dem Softwarepaket DNASTar, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) wurden zwei Peptide ausgewählt, die mit gewisser Wahrscheinlichkeit eine Immunantwort hervorrufen.

Es handelt sich um folgende Peptide, die im Einbuchstabencode für Aminosäuren dargestellt sind:

B: C-K-R-V-Q-L-R-E-L-S-E-A-E-V-R-Q - CONH₂ / Pos. 594 - 608

5 C: C-Q-E-T-S-P-L-R-D-A-V-V-I-E-Q-S-S-S-L-N-E - CONH₂ / Pos. 781-800

Die unterstrichenen Cysteine stammen nicht aus der Telomerasesequenz, sondern wurden als Linker für die Kopplung zusätzlich angefügt

- 10 Die Peptide wurden über das Thiol-reaktive Kopplungsreagenz m-Maleimido-benzoyl-N-Hydroxysuccinimidester (MBS) an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) gekoppelt. Damit wurden je zwei Kaninchen im Abstand von 2 bis 4 Wochen immunisiert. Vor der Immunisierung wurden 5 ml Blut zur Gewinnung von Preimmunseren entnommen. Nach 4 Immunisierungen wurden ebenfalls 5 ml Blut zur Gewinnung von Immunseren entnommen.
- 15 Diese Seren wurden in einem Western-Blot Experiment (Ausubel *et al.*, 1987) auf Reaktivität mit Fusionsproteinen (Beispiel 13) getestet.

Beispiel 13

- 20 Um das Protein der katalytischen Telomerase-Untereinheit analysieren zu können, wurden bakterielle Expressionversuche durchgeführt.

Die Konstrukte für diese Experimente sind im Folgenden beschrieben:

- 25 Für das Expressionskonstrukt pMalEST wurde das Insert des in Beispiel 2 erwähnten Klons AA281296 mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Not I herausgeschnitten, die Schnittstellen mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt (Ausubel *et al.*, 1987) und in den vorgegebenen Leserahmen des Maltose bindenden Proteins des bakteriellen Expressionsvektors pMAL-C2 (Fa. New England Biolabs) kloniert. Der Vektor pMAL-C2
- 30 wurde mit dem Restriktionsenzym Pst I verdaut und die überstehenden Einzelstrangenden mit der T4 DNA Polymerase entfernt (Ausubel *et al.*, 1987).

Das Expressionskonstrukt pMalA1 beinhaltet die Nukleotidsequenz der Fig. 1 von Position 1789 bis Position 3908. Dieses DNA-Fragment wurde über PCR mit den Primern C5A (5'-ACCGGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTG-3') und C3B (5'-GCACACCTTTGGTCACTCCAAATTCC-3') aus einer kommerziell erhältlichen K562
5 Marathon-Ready cDNA Library (Fa. Clontech, Katalognummer 7441-1) amplifiziert und in TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO der Fa. Invitrogen kloniert. Die PCR-Bedingungen wurden wie im Beispiel 7 beschrieben durchgeführt. Für das Expressionskonstrukt pMalA1 wurde das Insert mit dem Restriktionsenzym Eco RI herausgeschnitten, die Schnittstellen mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt (Ausubel *et al.*, 1987) und in den mit dem
10 Restriktionsenzym Xmn I geschnittenen bakteriellen Expressionvektors pMAL-C2 (Fa. New England Biolabs) kloniert.

Die Proteinexpression unter Verwendung dieser Konstrukte erfolgte in dem Bakterienstamm *E. coli* DH5 α . Die Expressionsbedingungen erfolgten wie in der Betriebsanleitung
15 der Fa. New England Biolabs (Katalognummer 800) beschrieben. Die hergestellten bakteriellen Lysate wurden in einem Western-Blot Experiment (Ausubel *et al.*, 1987) getestet.

Beispiel 14

20 Die bakteriellen Lysate aus Beispiel 13 wurden unter Zuhilfenahme der Antiseren aus Beispiel 12 in einem Western Blot (Ausubel *et al.*, 1987) analysiert.

Da der Fusionsanteil für das Maltose bindende Protein etwa 43 kDa groß ist, werden für die Konstrukte pMalEST und pMalA1 Fusionsproteine in der Größe von etwa 74 kDa bzw 106
25 kDa erwartet.

Im Vergleich der Pre-Immunsere mit den Seren nach der ersten Immunisierung wird ersichtlich, daß spezifische Antikörper gegen die Epitope B und C gebildet wurden (Fig. 16). Darüber hinaus wurden neben den erwarteten 74 kDa, bzw. 106 kDa-Proteinen auch
30 kleinere Proteinfragmente beobachtet, die mit den Antiseren reagieren. Diese kleineren Produkte gehen wahrscheinlich auf vorzeitige zurück.

Auf dem Fusionsprotein aus der Expression mit pMal EST befindet sich nur das Epitop für Serum B. Im Gegensatz dazu befinden sich auf dem Fusionsprotein von pMalA1 die Epitope der Seren B und C. Aus diesem Grunde erkennt das Antiserum C nicht das Expressionsprodukt von pMalEST und lediglich die größeren Proteinfragmente aus den Expressionversuchen mit pMalA1. Diese Beobachtung unterstreicht die hohe Spezifität der generierten Antiseren.

Beispiel 15

Um das Protein der katalytischen Telomerase-Untereinheit analysieren zu können, sollen die Proteinkomponente zusammen mit der RNA-Komponente *in vitro* rekonstituiert werden.

Die Konstrukte für diese Experimente sind im folgenden beschrieben:

Die 504 nt lange RNA Komponente (Feng *et al.*, 1995) wurde mit den Primern HTR9BAM (5'-CGCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTTGCGGAGGGTGGGCCTG-3') und HTR2BAM (5'-CGCGGATCCCGGCGAGGGGTGACGGATGC-3) aus einer 293 Zell-cDNA-Bibliothek amplifiziert. Der Primer HTR9BAM beinhaltet von Nukleotid 10 bis 29 einen T7 Promotor. In der PCR wurden in einem Endvolumen von 100 µl 3 µl cDNA aus 293-Zellen mit 10 pmol dNTP-Mix versetzt und in 1 x PCR-Reaktionspuffer mit 0,5 µl Taq-Polymerase (Fa. Gibco) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Je 10 pmol der Primer HTR9BAM und HTR2BAM wurden zugefügt. Die PCR wurde in 3 Schritten durchgeführt. An eine zehnminütige Denaturierung bei 94°C schlossen sich 35 PCR-Zyklen an, in denen die DNA zunächst für eine Minute bei 94°C denaturiert wurde und anschließend für 2 min bei 62°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert wurde. Zum Abschluß folgte für 4 min eine Kettenverlängerung bei 72°C. Die entstandenen PCR-Produkte wurden nach einem Restriktionsverdau mit Bam HI in die Bam HI-Schnittstelle des Vektor pUC19 kloniert, so daß die RNA Komponente unter Kontrolle des T7-Promotors steht. Dieses Konstrukt wird im folgenden als HTR504 bezeichnet.

Das 3411 bp lange cDNA Fragment (Position 60 bis Position 3470, Fig. 1) wurde in den Vektor PCR II TOPO (Fa. Invitrogen) kloniert. Detailliertere Angaben zur Klonierung sind

in Beispiel 8 und 7, bzw. in Fig. 12 beschrieben. In diesem als HTC FL bezeichneten Konstrukt liegt der T7 Promotor 5' vor der hTC cDNA.

Die Synthese der katalytischen Telomerase-Proteinkomponente erfolgte nach Zugabe des hTC FL-Konstruktes in einem kommerziell erhältlichen Transkriptions/Translation-System nach Angaben des Herstellers (Fa. Promega; Katalognummer L4610). Die erfolgreiche *in vitro* Translation des erwarteten 127 kDa Produktes wurde mittels ³⁵S-markiertem Cystein in einer SDS-PAGE (Ausubel *et al.*, 1987) kontrolliert (Fig. 17).

Die Synthese der Telomerase-RNA-Komponente erfolgte mit einem Transkriptions-System nach Angaben des Herstellers (Fa. Ambion; Katalognummer 1344) oder nach der von Pokrovskaya und Gurevich (1994) beschriebenen Methode.

Für die *in vitro* Rekonstitution wurden 50 µl des oben beschriebenen Translations-Ansatzes mit dem hTC FL-Konstrukt mit 0,5 µg hTRNA versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. 2 µl dieser Mischung wurden auf ihre enzymatische Aktivität mit Hilfe des TRAP-Assays untersucht (N.W. Kim *et al.*, 1994). Als Positivkontrolle diente eine Aktivitätsmessung nach gleicher Methode von aus HeLa-Zellen gereinigter Telomerase (Shay *et al.*, 1994). Wie in Fig. 18 zu sehen, erzeugen sowohl das rekonstituierte Enzym als auch das native Enzym das gleiche Produktmuster, die für die Telomerase charakteristische Nukleotidleiter. Mit diesem Ergebnis wurde darüberhinaus belegt, daß eine einzige Proteinkomponente zusammen mit der RNA für die enzymatische Telomeraseaktivität ausreichend ist.

Zusätzlich zu dem beschriebenen TRAP-Assay wurden 5 µl der Rekonstitutionsmischung im direkten Telomerase-Assay (Shay *et al.*, 1994) auf ihre Aktivität geprüft. Auch in diesem Experiment belegt die charakteristische Nukleotidleiter die erfolgreiche Rekonstitution von rekombinantem hTC Protein und Telomerase-RNA-Komponente.

Zusammenfassend konnte hiermit auf funktioneller Ebene gezeigt werden, daß die identifizierte und vollständig klonierte hTC cDNA die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase darstellt.

Literaturverzeichnis

Adams, M.D., Dubnick, M., Kerlavage, A.R., Moreno, R., Kelley, J.M., Utterback, T.R., Nagle, J.W.,
Fields, C. und Venter, J.C. (1992). Sequence identification of 2.375 human brain genes. *Nature* 355: 632-
634.

Allsopp, R. C., Vazire, H., Pattersson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W.
und Harley, C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl.*
Acad. Sci. 89, 10114-10118.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. *et al.* (1990). Basic local alignment search tool. *J.*
Mol. Biol. 215, 403-410.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Scidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1987).
Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences, New York.

Blasco, M. A., Rizen, M., Greider, C. W. und Hanahan, D. (1996). Differential regulation of telomerase
activity and telomerase RNA during multistage tumorigenesis. *Nature Genetics* 12, 200-204.

Broccoli, D., Young, J. W. und deLange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant
hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9082-9086.

Collins, K., Kobayashi, R. und Greider, C. W. (1995). Purification of Tetrahymena telomerase and
cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell* 81, 677-686.

Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G. Greider, C.W. Harley, C. B. und
Bacchetti S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal
cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11, 1921-1929.

Counter, C. M., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B. und Baccetti, S. (1995). Telomerase activity in
normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85, 2315-2320.

Feng, J., Funk, W. D., Wang, S.-S., Weinrich, S. L., Avilion, A.A., Chiu, C.-P., Adams, R.R., Chang,
E., Allsopp, R.C., Yu, J., Le, S., West, M.D., Harley, C.B., Andrews, W.H., Greider, C.W. und
Villeponteu, B. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-1241.

Gerhold, D. und Caskey, T. (1996). It's the genes! EST access to human genome content. *BioEssays* 18,
973-981.

Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: The human fibroblast comes of age. *Science* 249, 1129-1133.

5 Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.

Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887-898.

10 Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331-337.

Harley, C. B., Futcher, A. B. und Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.

15 Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Amgen EST Program, Bass, M.B., Arruda, I. und Robinson, M.O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275: 973-977.

20 Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D.K. und Allshire, R.C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 866-868.

25 Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M.A., Shay, J.W., Ishioka, S. und Yamakido, M. (1995). Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 155, 3711-3715.

Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C. B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. und Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.

30 Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V. und Cech T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276: 561-567.

35 Lundblad, V. und Szostak, J. W. (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57, 633-643.

McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26, 234-282.

Meyne, J., Ratliff, R. L. und Moyzis, R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 7049-7053.

5 Okubo, K., Hori, N., Matoba, R., Niiyama, T., Fukushima, A., Kojima, Y. and Matsubra, K. (1992). Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. Nature Genetics 2: 173-179.

Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. J. Theor. Biol. 41, 181-190.

10 Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. und Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. EMBO J. 8: 3867-3874.

Pokrovskaya, I.D. and Gurevich, V.V. (1994). *In vitro* transcription: Preparative RNA yields in analytical scale reactions. Analytical Biochemistry 220, 420-423.

15 Prowse, K. R., Avilion, A. A. und Greider, C. W. (1993). Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 1493-1497.

20 Sandell, L. L. und Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery and chromosome loss. Cell 75, 729-739.

Shampay, J. und Blackburn, E. H. (1988). Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 534-538.

25 Shay, J. W., Brasiskyte, D., Ouellette, M., Piatyszek, M.A., Werbin, H., Ying, Y. and Wright, E.W. (1994). Analysis of telomerase and telomeres. Methods of Molecular Genetics 5, 263-280.

Shay, J. W. (1997). Telomerae and Cancer. Ciba Foundation Meeting: Telomeres and Telomerase. London.

30 Singer, M. S. und Gottschling, D. E. (1994). *TLCl*: Template RNA Component of *Saccharomyces cerevisiae* Telomerase. Science 266, 404-409.

35 Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C.B. und Landsdorp, P.M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 9857-9860.

Xiong, Y. und Eickbush, T.H. (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. EMBO J. 9: 3353-3362.

Yu, G.-L., Bradley, J. D., Attardi, L. D. und Blackburn, E. H. (1990). *In vivo* alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. Nature 344, 126-132.

- 5 Zakian, V. A. (1995). Telomeres: Beginning to understand the end. Science 270, 1601-1607.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Bayer AG
- (B) STRASSE: Bayerwerk
- (C) ORT: Leverkusen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-51368
- (G) TELEFON: 0214-303688
- (H) TELEFAX: 0214-303482

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Humane katalytische Telomerase-Untereinheit
und deren diagnostische und therapeutische Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4042 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | |
|---|-----|
| GTTCAGGCA GCGCTGCGTC CTGCTGCGCA CGTGGGAAGC CCTGGCCCCG GCCACCCCCG | 60 |
| CGATGCCGCG CGCTCCCCGC TGCCGAGCCG TGCGTCCCT GCTGCGCAGC CACTACCGCG | 120 |
| AGGTGCTGCC GCTGGCCACG TTCGTGCGGC GCCTGGGGCC CCAGGGCTGG CGGCTGGTGC | 180 |
| AGCGCGGGGA CCCGCGGGCT TTCCGCGCGC TGGTGGCCCA GTGCCTGGTG TGCGTGCCCT | 240 |
| GGGACGCACG GCCGCCCCC GCCGCCCCCT CCTTCCGCCA GGTGTCCTGC CTGAAGGAGC | 300 |
| TGGTGGCCCG AGTGCTGCAG AGGCTGTGCG AGCGCGGCGC GAAGAACGTG CTGGCCTTCG | 360 |
| GCTTCGCGCT GCTGGACGGG GCGCGCGGGG GCGCCCCCGA GGCCTTCACC ACCAGCGTGC | 420 |

| | | | | | | |
|------------|------------|--------------|------------|-------------|-------------|------|
| GCAGCTACCT | GCCCAACACG | GTGACCGACG | CACTGCGGGG | GAGCGGGGCG | TGGGGGCTGC | 480 |
| TGCTGCGCCG | CGTGGGCGAC | GACGTGCTGG | TTCACCTGCT | GGCACGCTGC | GCGCTCTTTG | 540 |
| TGCTGGTGGC | TCCCAGCTGC | GCCTACCAGG | TGTGCGGGCC | GCCGCTGTAC | CAGCTCGGCG | 600 |
| CTGCCACTCA | GGCCCCGGCC | CCGCCACACG | CTAGTGGACC | CCGAAGGCGT | CTGGGATGCG | 660 |
| AACGGGCCTG | GAACCATAGC | GTCAGGGAGG | CCGGGGTCCC | CCTGGGCCTG | CCAGCCCCGG | 720 |
| GTGCGAGGAG | GCGCGGGGCG | AGTGCCAGCC | GAAGTCTGCC | GTTGCCCAAG | AGGCCCAGGC | 780 |
| GTGGCGCTGC | CCCTGAGCCG | GAGCGGACGC | CCGTTGGGCA | GGGGTCCTGG | GCCCACCCGG | 840 |
| GCAGGACGCG | TGGACCGAGT | GACCGTGGTT | TCTGTGTGGT | GTCACCTGCC | AGACCCGCCG | 900 |
| AAGAAGCCAC | CTCTTTGGAG | GGTGCGCTCT | CTGGCACGCG | CCACTCCCAC | CCATCCGTGG | 960 |
| GCCGCCAGCA | CCACGCGGGC | CCCCCATCCA | CATCGCGGCC | ACCACGTCCC | TGGGACACGC | 1020 |
| CTTGTCCCCC | GGTGTACGCC | GAGACCAAGC | ACTTCCTCTA | CTCCTCAGGC | GACAAGGAGC | 1080 |
| AGCTGCGGCC | CTCCTTCCTA | CTCAGCTCTC | TGAGGCCCAG | CCTGACTGGC | GCTCGGAGGC | 1140 |
| TCGTGGAGAC | CATCTTTCTG | GGTTCCAGGC | CCTGGATGCC | AGGGACTCCC | CGCAGGTTGC | 1200 |
| CCCCCTGCC | CCAGCGCTAC | TGGCAAATGC | GGCCCCTGTT | TCTGGAGCTG | CTTGGGAACC | 1260 |
| ACGCGCAGTG | CCCCTACGGG | GTGCTCCTCA | AGACGCACTG | CCCCTGCGA | GCTGCGGTCA | 1320 |
| CCCCAGCAGC | CGGTGTCTGT | GCCC GG GAGA | AGCCCCAGGG | CTCTGTGGCG | GCCCCCGAGG | 1380 |
| AGGAGGACAC | AGACCCCCGT | CGCCTGGTGC | AGCTGCTCCG | CCAGCACAGC | AGCCCCCTGGC | 1440 |
| AGGTGTACGG | CTTCGTGCGG | GCCTGCCTGC | GCCGGCTGGT | GCCCCCAGGC | CTCTGGGGCT | 1500 |
| CCAGGCACAA | CGAACGCCGC | TTCCTCAGGA | ACACCAAGAA | GTTTCATCTCC | CTGGGGAAGC | 1560 |
| ATGCCAAGCT | CTCGCTGCAG | GAGCTGACGT | GGAAGATGAG | CGTGCGGGAC | TGCGCTTGGC | 1620 |
| TGCGCAGGAG | CCCAGGGGTT | GGCTGTGTTC | CGGCCGCGAG | GCACCGTCTG | CGTGAGGAGA | 1680 |
| TCCTGGCCAA | GTTCTGCAC | TGGCTGATGA | GTGTGTACGT | CGTCGAGCTG | CTCAGGTCTT | 1740 |
| TCTTTTATGT | CACGGAGACC | ACGTTTCAA | AGAACAGGCT | CTTTTCTAC | CGGAAGAGTG | 1800 |
| TCTGGAGCAA | GTTGCAAAGC | ATTGGAATCA | GACAGCACTT | GAAGAGGGTG | CAGCTGCGGG | 1860 |
| AGCTGTCGGA | AGCAGAGGTC | AGGCAGCATC | GGGAAGCCAG | GCCCCCCTG | CTGACGTCCA | 1920 |
| GACTCCGCTT | CATCCCCAAG | CCTGACGGGC | TGCGGCCGAT | TGTGAACATG | GACTACGTCTG | 1980 |
| TGGGAGCCAG | AACGTTCGCG | AGAGAAAAGA | GGGCCGAGCG | TCTCACCTCG | AGGGTGAAGG | 2040 |
| CACTGTTTCA | GCTGCTCAAC | TACGAGCGGG | CGCGGCGCCC | CGGCCTCCTG | GGCGCCTCTG | 2100 |
| TGCTGGGCCT | GGACGATATC | CACAGGGCCT | GGCGCACCTT | CGTGCTGCGT | GTGCGGGCCC | 2160 |
| AGGACCCGCC | GCCTGAGCTG | TACTTTGTCA | AGGTGGATGT | GACGGGCGCG | TACGACACCA | 2220 |

| | |
|--|------|
| TCCCCCAGGA CAGGCTCACG GAGGTCATCG CCAGCATCAT CAAACCCAG AACACGTACT | 2280 |
| GCGTGCGTCG GTATGCCGTG GTCCAGAAGG CCGCCCATGG GCACGTCCGC AAGGCCTTCA | 2340 |
| AGAGCCACGT CTCTACCTTG ACAGACCTCC AGCCGTACAT GCGACAGTTC GTGGCTCACC | 2400 |
| TGCAGGAGAC CAGCCCGCTG AGGGATGCCG TCGTCATCGA GCAGAGCTCC TCCCTGAATG | 2460 |
| AGGCCAGCAG TGGCCTCTTC GACGTCTTCC TACGCTTCAT GTGCCACCAC GCCGTGCGCA | 2520 |
| TCAGGGGCAA GTCCTACGTC CAGTGCCAGG GGATCCCGCA GGGCTCCATC CTCTCCACGC | 2580 |
| TGCTCTGCAG CCTGTGCTAC GGCACATGG AGAACAAAGCT GTTTGCGGGG ATTCGGCGGG | 2640 |
| ACGGGCTGCT CCTGCGTTTG GTGGATGATT TCTTGTTGGT GACACCTCAC CTCACCCACG | 2700 |
| CGAAAACCTT CCTCAGGACC CTGGTCCGAG GTGTCCCTGA GTATGGCTGC GTGGTGAAC | 2760 |
| TGCGGAAGAC AGTGGTGAAC TTCCCTGTAG AAGACGAGGC CCTGGGTGGC ACGGCTTTTG | 2820 |
| TTCAGATGCC GGCCACGGC CTATTCCCTT GGTGCGGCCT GCTGCTGGAT ACCCGGACCC | 2880 |
| TGGAGGTGCA GAGCGACTAC TCCAGCTATG CCCGGACCTC CATCAGAGCC AGTCTCACCT | 2940 |
| TCAACCGCGG CTTCAAGGCT GGGAGGAACA TGCGTCGCAA ACTCTTTGGG GTCTTGCGGC | 3000 |
| TGAAGTGCA CAGCCTGTTT CTGGATTGTC AGGTGAACAG CCTCCAGACG GTGTGCACCA | 3060 |
| ACATCTACAA GATCCTCCTG CTGCAGGCGT ACAGGTTTCA CGCATGTGTG CTGCAGCTCC | 3120 |
| CATTTTCATCA GCAAGTTTGG AAGAACCCCA CATTTTTCCT GCGCGTCATC TCTGACACGG | 3180 |
| CCTCCCTCTG CTACTCCATC CTGAAAGCCA AGAACGCAGG GATGTCGCTG GGGGCCAAGG | 3240 |
| GCGCCGCCGG CCCTCTGCCC TCCGAGGCCG TGCAGTGGCT GTGCCACCAA GCATTCCCTGC | 3300 |
| TCAAGCTGAC TCGACACCGT GTCACCTACG TGCCACTCCT GGGGTCACCTC AGGACAGCCC | 3360 |
| AGACGCAGCT GAGTCGGAAG CTCCCGGGGA CGACGCTGAC TGCCCTGGAG GCCGCAGCCA | 3420 |
| ACCCGGCACT GCCCTCAGAC TTCAAGACCA TCCTGGACTG ATGGCCACCC GCCCAGAGCC | 3480 |
| AGGCCGAGAG CAGACACCAG CAGCCCTGTC ACGCCGGGCT CTACGTCCCA GGGAGGGAGG | 3540 |
| GGCGGCCAC ACCCAGGCC GCACCGCTGG GAGTCTGAGG CCTGAGTGAG TGTTTGCCG | 3600 |
| AGGCCTGCAT GTCCGGCTGA AGGCTGAGTG TCCGGCTGAG GCCTGAGCGA GTGTCCAGCC | 3660 |
| AAGGGCTGAG TGTCCAGCAC ACCTGCCGTC TTTACTTCCC CACAGGCTGG CGCTCGGCTC | 3720 |
| CACCCAGGG CCAGCTTTTC CTCACCAGGA GCGCGCTTC CACTCCCCAC ATAGGAATAG | 3780 |
| TCCATCCCCA GATTGCGCAT TGTTACCCC TCGCCCTGCC CTCCTTTGCC TTCCACCCCC | 3840 |
| ACCATCCAGG TGGAGACCCT GAGAAGGACC CTGGGAGCTC TGGGAATTTG GAGTGACCAA | 3900 |
| AGGTGTGCCC TGTACACAGG CGAGGACCCT GCACCTGGAT GGGGGTCCCT GTGGGTCAAA | 3960 |
| TTGGGGGGAG GTGCTGTGGG AGTAAAATAC TGAATATATG AGTTTTTCAG TTTTGAAAAA | 4020 |
| AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA | 4042 |

- 47 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LNGE: 1132 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRNLICHE HERKUNFT:

- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
1           5           10           15
His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
20          25          30
Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
35          40          45
Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
50          55          60
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
65          70          75          80
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
85          90          95
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
100         105         110
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr
115        120        125
Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
130        135        140
Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
145        150        155        160
Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr
165        170        175
Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
180        185        190
Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
195        200        205
Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg

```

| | | |
|---|-----|---------|
| 210 | 215 | 220 |
| Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg | | |
| 225 | 230 | 235 240 |
| Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp | | |
| | 245 | 250 255 |
| Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val | | |
| | 260 | 265 270 |
| Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala | | |
| | 275 | 280 285 |
| Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His | | |
| | 290 | 295 300 |
| Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro | | |
| 305 | 310 | 315 320 |
| Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly | | |
| | 325 | 330 335 |
| Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro | | |
| | 340 | 345 350 |
| Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser | | |
| | 355 | 360 365 |
| Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln | | |
| | 370 | 375 380 |
| Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His | | |
| 385 | 390 | 395 400 |
| Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg | | |
| | 405 | 410 415 |
| Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln | | |
| | 420 | 425 430 |
| Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu | | |
| | 435 | 440 445 |
| Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe | | |
| | 450 | 455 460 |
| Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser | | |
| 465 | 470 | 475 480 |
| Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser | | |
| | 485 | 490 495 |
| Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met | | |
| | 500 | 505 510 |
| Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys | | |
| | 515 | 520 525 |
| Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe | | |
| | 530 | 535 540 |

Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe
 545 550 555 560
 Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr
 565 570 575
 Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
 580 585 590
 Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln
 595 600 605
 His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 610 615 620
 Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val
 625 630 635 640
 Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser
 645 650 655
 Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
 660 665 670
 Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
 675 680 685
 Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
 690 695 700
 Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
 705 710 715 720
 Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln
 725 730 735
 Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His
 740 745 750
 Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp
 755 760 765
 Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser
 770 775 780
 Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu
 785 790 795 800
 Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His
 805 810 815
 Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro
 820 825 830
 Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp
 835 840 845
 Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu
 850 855 860

- 50 -

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala
 865 870 875 880
 Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys
 885 890 895
 Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu
 900 905 910
 Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe
 915 920 925
 Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser
 930 935 940
 Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe
 945 950 955 960
 Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly
 965 970 975
 Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn
 980 985 990
 Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln
 995 1000 1005
 Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln
 1010 1015 1020
 Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala
 1025 1030 1035 1040
 Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu
 1045 1050 1055
 Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp
 1060 1065 1070
 Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr
 1075 1080 1085
 Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser
 1090 1095 1100
 Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn
 1105 1110 1115 1120
 Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
 1125 1130

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÖNGE: 1153 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

| | |
|---|------|
| GTGCCTGCAG AGACCCGTCT GGTGCACTCT GATTCTCCAC TTGCCTGTTG CATGTCCTCG | 60 |
| TTCCCTTGTT TCTCACCACC TCTTGGGTG CCATGTGCGT TTCCTGCCGA GTGTGTGTTG | 120 |
| ATCCTCTCGT TGCCTCCTGG TCACTGGGCA TTTGCTTTTA TTTCTCTTTG CTTAGTGTTA | 180 |
| CCCCCTGATC TTTTATTGT CGTTGTTTGC TTTTGTATAT TGAGACAGTC TCACTCTGTC | 240 |
| ACCCAGGCTG GAGTGTAATG GCACAATCTC GGCTCACTGC AACCTCTGCC TCCTCGGTTC | 300 |
| AAGCAGTTCT CATTCCTCAA CCTCATGAGT AGCTGGGATT ACAGGCGCCC ACCACCACGC | 360 |
| CTGGCTAATT TTTGTATTTT TAGTAGAGAT AGGCTTTCAC CATGTTGGCC AGGCTGGTCT | 420 |
| CAAACCTCTG ACCTCAAGTG ATCTGCCCCG CTTGGCCTCC CACAGTGCTG GGATTACAGG | 480 |
| TGCAAGCCAC CGTGCCCGG ATACCTTGAT CTTTTAAAT GAAGTCTGAA ACATTGCTAC | 540 |
| CCTTGTCCTG AGCAATAAGA CCCTTAGTGT ATTTTAGCTC TGGCCACCCC CCAGCCTGTG | 600 |
| TGCTGTTTTT CCTGCTGACT TAGTTCTATC TCAGGCATCT TGACACCCCC ACAAGCTAAG | 660 |
| CATTATTAAT ATTGTTTTCC GTGTGAGTG TTTCTTTAGC TTTGCCCCG CCCTGCTTTT | 720 |
| CCTCCTTTGT TCCCCGTCTG TCTTCTGTCT CAGGCCCGCC GTCTGGGGTC CCCTTCCTTG | 780 |
| TCCTTTGCGT GGTCTTCTG TCTTGTTATT GCTGGTAAAC CCCAGCTTTA CCTGTGCTGG | 840 |
| CCTCCATGGC ATCTAGCGAC GTCCGGGGAC CTCTGCTTAT GATGCACAGA TGAAGATGTG | 900 |
| GAGACTCAG AGGAGGGCGG TCATCTTGGC CCGTGAGTGT CTGGAGCACC ACGTGGCCAG | 960 |
| CGTTCCTTAG CCAGGGTTGG CTGTGTCCG GCCGCAGAGC ACCGTCTGCG TGAGGAGATC | 1020 |
| CTGGCCAAGT TCCTGCACTG GCTGATGAGT GTGTACGTCG TCGAGCTGCT CAGGTCTTTC | 1080 |
| TTTTATGTCA CGGAGACCAC GTTCAAAG AACAGGCTCT TTTTCTACCG GAAGAGTGTC | 1140 |
| TGGAGCAAGT TGC | 1153 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÖNGE: 412 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

| | |
|---|-----|
| CAGAGCCCTG GTCCTCCTGT CTCCATCGTC ACGTGGGCAC ACGTGGCTTT TCGCTCAGGA | 60 |
| CGTCGAGTGG ACACGGTGAT CTCTGCCTCT GCTCTCCCTC CTGTCCAGTT TGCATAAACT | 120 |
| TACGAGGTTC ACCTTCACGT TTTGATGGAC ACGCGGTTTC CAGGCACCGA GGCCAGAGCA | 180 |
| GTGAACAGAG GAGGCTGGGC GCGGCAGTGG AGCCGGGTTG CCGGCAATGG GGAGAAGTGT | 240 |
| CTGGAAGCAC AGACGCTCTG GCGAGGGTGC CTGCAGAGAC CCGCCTGGTG CACTCTGATT | 300 |
| CTCCACTTGC CTGTTGCATG TCCTCGTTCC CTTGTTTCTC ACCACCTCTT GGGTTGCCAT | 360 |
| GTGCGTTTCC TGCCGAGTGT GTGTTGATCC TCTCGTTGCC TCCTGGTCAC TG | 412 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÖNGE: 1012 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

| | |
|---|-----|
| GGGGTCCTGG GCCACCCGG GCAGGACGCG TGGACCGAGT GACCGTGGTT TCTGTGTGGT | 60 |
| GTCACCTGCC AGACCCGCCG AAGAAGCCAC CTCTTTGGAG GGTGCGCTCT CTGGCACGCG | 120 |
| CCACTCCAC CCATCCGTGG GCCGCCAGCA CCACGCGGGC CCCCCATCCA CATCGCGGCC | 180 |
| ACCACGTCCC TGGGACACGC CTTGTCCCCC GGTGTACGCC GAGACCAAGC ACTTCCTCTA | 240 |
| CTCCTCAGGC GACAAGGAGC AGCTGCGGCC CTCCTTCCTA CTCAGCTCTC TGAGGCCAG | 300 |
| CCTGACTGGC GCTCGGAGGC TCGTGAGAC CATCTTTCTG GGTTCAGGC CCTGGATGCC | 360 |
| AGGGACTCCC CGCAGGTTGC CCCGCTGCC CCAGCGCTAC TGGCAAATGC GGCCCTGTT | 420 |
| TCTGGAGCTG CTTGGGAACC ACGCGCAGTG CCCCTACGGG GTGCTCCTCA AGACGCACTG | 480 |
| CCCGCTGCGA GCTGCGGTCA CCCCAGCAGC CGGTGTCTGT GCCCGGGAGA AGCCCCAGGG | 540 |

```

CTCTGTGGCG GCCCCGAGG AGGAGGACAC AGACCCCGT CGCCTGGTGC AGCTGCTCCG      600
CCAGCACAGC AGCCCTGGC AGGTGTACGG CTTCTGTCGG GCCTGCCTGC GCCGGCTGGT      660
GCCCCAGGC CTCTGGGGCT CCAGGCACAA CGAACGCCGC TTCCTCAGGA ACACCAAGAA      720
GTTTCATCTCC CTGGGGAAGC ATGCCAAGCT CTCGCTGCAG GAGCTGACGT GGAAGATGAG      780
CGTGGCGGAC TGCGCTTGGC TGCGCAGGAG CCCAGGTGAG GAGGTGGTGG CCGTCGAGGG      840
CCCAGGCCCC AGAGCTGAAT GCAGTAGGGG CTCAGAAAAG GGGGCAGGCA GAGCCCTGGT      900
CCTCCTGTCT CCATCGTCAC GTGGGCACAC GTGGCTTTTC GCTCAGGACG TCGAGTGGAC      960
ACGGTGATCT CTGCCTCTGC TCTCCCTCCT GTCCAGTTTG CATAAACTTA CG          1012

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÖNGE: 3972 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

```

GAATTCGCGG CCGCGTCGAC GTTTCAGGCA GCGCTGCGTC CTGCTGCGCA CGTGGGAAGC      60
CCTGGCCCCG GCCACCCCG CGATGCCGCG CGCTCCCCGC TGCCGAGCCG TGCGCTCCCT      120
GCTGCGCAGC CACTACCGCG AGGTGCTGCC GCTGGCCACG TTCGTGCGGC GCCTGGGGCC      180
CCAGGGCTGG CGGCTGGTGC AGCGCGGGGA CCCGGCGGCT TTCCGCGCGC TGGTGGCCCA      240
GTGCCTGGTG TGCGTGCCCT GGGACGCACG GCCGCCCCC GCCGCCCCCT CCTTCCGCCA      300
GGTGTCTTGC CTGAAGGAGC TGGTGGCCCG AGTGCTGCAG AGGCTGTGCG AGCGCGGCGC      360
GAAGAACGTG CTGGCCTTCG GCTTCGCGCT GCTGGACGGG GCCCGCGGGG GCCCCCCGA      420
GGCCTTCACC ACCAGCGTGC GCAGCTACCT GCCCAACACG GTGACCGACG CACTGCGGGG      480
GAGCGGGGCG TGGGGGCTGC TGCTGCGCCG CGTGGGCGAC GACGTGCTGG TTCACCTGCT      540
GGCACGCTGC GCGCTCTTTG TGCTGGTGGC TCCCAGCTGC GCCTACCAGG TGTGCGGGCC      600
GCCGCTGTAC CAGCTCGGCG CTGCCACTCA GGCCCGGCCC CCGCCACACG CTAGTGGACC      660
CCGAAGGCGT CTGGGATGCG AACGGGCCTG GAACCATAGC GTCAGGGAGG CCGGGGTCCC      720

```


| | |
|--|------|
| CCTGGGCCTG CCAGCCCCGG GTGCGAGGAG GCGCGGGGGC AGTGCCAGCC GAAGTCTGCC | 780 |
| GTTGCCCAAG AGGCCCAGGC GTGGCGCTGC CCCTGAGCCG GAGCGGACGC CCGTTGGGCA | 840 |
| GGGGTCCTGG GCCCACC CGG GCAGGACGCG TGGACCGAGT GACCGTGGTT TCTGTGTGGT | 900 |
| GTCACCTGCC AGACCCGCCG AAGAAGCCAC CTCTTTGGAG GGTGCGCTCT CTGGCAGCGC | 960 |
| CCACTCCCAC CCATCCGTGG GCCGCCAGCA CCACGCGGGC CCCCCATCCA CATCGCGGCC | 1020 |
| ACCACGTCCC TGGGACACGC CTTGTCCCCC GGTGTACGCC GAGACCAAGC ACTTCCTCTA | 1080 |
| CTCCTCAGGC GACAAGGAGC AGCTGCGGCC CTCCTTCCTA CTCAGCTCTC TGAGGCCCCAG | 1140 |
| CCTGACTGGC GCTCGGAGGC TCGTGGAGAC CATCTTTCTG GGTTCAGGC CCTGGATGCC | 1200 |
| AGGGACTCCC CGCAGGTTGC CCCGCCTGCC CCACGCGTAC TGGCAAATGC GGCCCTGTT | 1260 |
| TCTGGAGCTG CTTGGGAACC ACGCGCAGTG CCCCTACGGG GTGCTCCTCA AGACGCACTG | 1320 |
| CCCCTGCGA GCTGCGGTCA CCCAGCAGC CGGTGTCTGT GCCCGGGAGA AGCCCCAGGG | 1380 |
| CTCTGTGGCG GCCCCGAGG AGGAGGACAC AGACCCCGT CGCCTGGTGC AGCTGCTCCG | 1440 |
| CCAGCACAGC AGCCCTGGC AGGTGTACGG CTTCTGTGCG GCCTGCCTGC GCCGGCTGGT | 1500 |
| GCCCCCAGGC CTCTGGGGCT CCAGGCACAA CGAACGCCGC TTCCTCAGGA ACACCAAGAA | 1560 |
| GTTTCATCTC CTGGGGAAGC ATGCCAAGCT CTCGCTGCAG GAGCTGACGT GGAAGATGAG | 1620 |
| CGTGCGGGAC TGCGCTTGCC TGCGCAGGAG CCCAGGTGAG GAGGTGGTGG CCGTCGAGGG | 1680 |
| CCCAGGCCCC AGAGCTGAAT GCAGTAGGGG CTCAGAAAAG GGGGCAGGCA GAGCCCTGGT | 1740 |
| CCTCCTGTCT CCATCGTCAC GTGGGCACAC GTGGCTTTTC GTCAGGACG TCGAGTGGAC | 1800 |
| ACGGTGATCT CTGCCTCTGC TCTCCCTCCT GTCCAGTTTG CATAAACTTA CGAGGTTCAC | 1860 |
| CTTCACGTTT TGATGGACAC GCGGTTTCCA GGC GCCGAGG CCAGAGCAGT GAACAGAGGA | 1920 |
| GGCTGGGCGC GGCAGTGGAG CCGGGTTGCC GGCAATGGGG AGAAGTGTCT GGAAGCACAG | 1980 |
| ACGCTCTGGC GAGGGTGCCT GCAGGGGTTG GCTGTGTTCC GGCCGCAGAG CACCGTCTGC | 2040 |
| GTGAGGAGAT CCTGGCCAAG TTCCTGCACT GGCTGATGAG TGTGTACGTC GTCGAGCTGC | 2100 |
| TCAGGTCTTT CTTTTATGTC ACGGAGACCA CGTTTCAAAA GAACAGGCTC TTTTCTACC | 2160 |
| GGAAGAGTGT CTGGAGCAAG TTGCAAAGCA TTGGAATCAG ACAGCACTTG AAGAGGGTGC | 2220 |
| AGCTGCGGGA GCTGTCGGAA GCAGAGGTCA GGCAGCATCG GGAAGCCAGG CCCGCCCTGC | 2280 |
| TGACGTCCAG ACTCCGCTTC ATCCCCAAGC CTGACGGGCT GCGGCCGATT GTGAACATGG | 2340 |
| ACTACGTCGT GGGAGCCAGA ACGTTCCGCA GAGAAAAGAG GGTGGCTGTG CTTTGGTTTA | 2400 |
| ACTTCCTTTT TAAACAGAAG TGCGTTTGAG CCCACATTT GGTATCAGCT TAGATGAAGG | 2460 |
| GCCCGGAGGA GGGGCCACGG GACACAGCCA GGGCCATGGC ACGGCGCCAA CCCATTTGTG | 2520 |

| | |
|--|------|
| CGCACGGTGA GGTGGCCGAG GTGCCGGTGC CTCCAGAAAA GCAGCGTGGG GGTGTAGGGG | 2580 |
| GAGCTCCTGG GGCAGGGACA GGCTCTGAGG ACCACAAGAA GCAGCTGGGC CAGGGCCTGG | 2640 |
| ATGCAGCACG GCCCGAGCGG GTGGGGGGCCC ACCACGCCAT TCTGGTCAAA GGTGTTGTAG | 2700 |
| TCGTAATAGC CGGCCCAGGC GCTCTGAACC TTCAGAGTCT CAAAAGCTGG GACCCCTCAGG | 2760 |
| GCCAAATGGG GCCACACCTT GTCCTGGAAG AAATCATGGT CCACTTCCAG GTTCGCCGGG | 2820 |
| TCCGGTTCTT CCTGCTCAGT GGGGCTACGA CCACCTAGGT AGTTGCTACC TAATCCTTCC | 2880 |
| CGGCGAAAAT AGGCTCCACT GGTGTCTGCA ACAAGCGGAG TCTCTAGGCC TGGTCCCTGG | 2940 |
| GGGCAGTGCC ACACATACAC ATACCTTTTC CTCGGCTCCA CAGGTAGCTT GGTGCCCTGC | 3000 |
| AGGGTGCCAG GCGGCCCTC TCCAACACCA GCCAGTGCTG CGATTGCGC AGACCAGGCT | 3060 |
| CCGGCTGCGT TGATCACAAT GCGCATTC ACAGGCTGGT ACTCCAGGCT GCGGTCCATC | 3120 |
| TTCACATGGA CTTCATGGAT CCTTTTCAAG ACCACCGCTT TGTCATCTGT GGTCAACATG | 3180 |
| CGTTGAGATG AAGAGACAAA ACGTGTCAAC TCTCCCTGGC AGAAAAGGAC TCCCAAGGAC | 3240 |
| TGGACCTTTC GCCGAAGCCC CTGGAGCAGA CACCAGGGGT CAAACCAACC TTCGTCTCC | 3300 |
| ATCCCATAAG ACGCCAAAGC CACTCCCTCT GTGTTTATCC AGGGAAACTT GTTCCGAAGC | 3360 |
| TGATCAGGAG ACATCAGAGA AACTTTGGCT CCCTCCTGCC TCTGCACTTT CACGTTGCTC | 3420 |
| TCCATGGCTG CAGCATCCTT TTCTGAAGCC AGCAAGAGGT AGCCCCAGGG GTTGAACCGG | 3480 |
| AGGTCCAGGG GAGGAGCATC GACTACGGCC AGGTACTCAT TGATGTTCCG TAGAAAGCTG | 3540 |
| GCTGAAAAGA GGGAGAGCTG GATGTTCTCA GGCAATGAGA ACTGCTGACA AATCCCACCT | 3600 |
| ACTGAGAGCC CAGTGGAGGC CTGTGAATAC GTGTGGTCCC GTTCCACCAC TAGCACTCGA | 3660 |
| ATAGCACCTC GTCTGCTCTC CAGCTTCTTC AGCCAATAGG CCACAGACAA GCCAAGCACC | 3720 |
| CCACCTCCCA CGATCACCAC ATCCGAGTGC TCGGGAGGCA GGTGGCTGGT GTCTTGCACT | 3780 |
| AGATCACAGG ACCTTCCAGG CAGGATCGAC TTGATCTTCT TCTTAATCTC AGACACCTTT | 3840 |
| CCATCCCAGT CCAGAGAAAA GCCTCCTCTG CGCGTGCCTG GCCTCCGGGT CAAGAGGCCC | 3900 |
| CGGCCCATGC CGTGCGGCAG AACCTCCGA ATCATAGCCC CTCTGAGCCC GGGTCGACGC | 3960 |
| GGCCGCGAAT TC | 3972 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2089 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(v) ART DES FRAGMENTS: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

| | |
|--|------|
| CCGGAAGAGT GTCTGGAGCA AGTTGCAAAG CATTGGAATC AGACAGCACT TGAAGAGGGT | 60 |
| GCAGCTGCGG GAGCTGTCGG AAGCAGAGGT CAGGCAGCAT CGGGAAGCCA GGGCCGCCCT | 120 |
| GCTGACGTCC AGACTCCGCT TCATCCCCAA GCCTGACGGG CTGCGGCCGA TTGTGAACAT | 180 |
| GGACTACGTC GTGGGAGCCA GAACGTTCCG CAGAGAAAAG AGGGCCGAGC GTCTCACCTC | 240 |
| GAGGGTGAAG GCACTGTTC ACGTGCTCAA CTACGAGCGG GCGCGGCGCC CCGGCCTCCT | 300 |
| GGGCGCCTCT GTGCTGGGCC TGGACGATAT CCACAGGGCC TGGCGCACCT TCGTGCTGCG | 360 |
| TGTGCGGGCC CAGGACCCGC CGCCTGAGCT GTACTTTGTC AAGGTGGATG TGACGGGCGC | 420 |
| GTACGACACC ATCCCCCAGG ACAGGCTCAC GGAGGTCATC GCCAGCATCA TCAAACCCCA | 480 |
| GAACACGTAC TGCCTGCGTC GGTATGCCGT GGTCCAGAAG GCCGCCCATG GGCACGTCCG | 540 |
| CAAGGCCTTC AAGAGCCACG TCTCTACCTT GACAGACCTC CAGCCGTACA TGCGACAGTT | 600 |
| CGTGGCTCAC CTGCAGGAGA CCAGCCCGCT GAGGGGTGCC GTCGTCATCG AGCAGAGCTC | 660 |
| CTCCCTGAAT GAGGCCAGCA GTGGCCTCTT CGACGTCTTC CTACGCTTCA TGTGCCACCA | 720 |
| CGCCGTGCGC ATCAGGGGCA AGTCCTACGT CCAGTGCCAG GGGATCCCGC AGGGCTCCAT | 780 |
| CCTCTCCACG CTGCTCTGCA GCCTGTGCTA CGGCGACATG GAGAACAAGC TGTTTGCGGG | 840 |
| GATTGCGCGG GACGGGCTGC TCCTGCGTTT GGTGGATGAT TTCTTGTTGG TGACACCTCA | 900 |
| CCTCACCCAC GCGAAAACCT TCCTCAGGAC CCTGGTCCGA GGTGTCCCTG AGTATGGCTG | 960 |
| CGTGGTGAAC TTGCGGAAGA CAGTGGTGAA CTTCCCTGTA GAAGACGAGG CCCTGGGTGG | 1020 |
| CACGGCTTTT GTTCAGATGC CGGCCACGG CCTATTCCCC TGGTGCGGCC TGCTGCTGGA | 1080 |
| TACCCGGACC CTGGAGGTGC AGAGCGACTA CTCCAGCTAT GCGCGGACCT CCATCAGAGC | 1140 |
| CAGTCTCACC TTCAACCGCG GCTTCAAGGC TGGGAGGAAC ATGCGTCGCA AACTCTTTGG | 1200 |
| GGTCTTGCGG CTGAAGTGTC ACAGCCTGTT TCTGGATTTG CAGGTGAACA GCCTCCAGAC | 1260 |
| GGTGTGCACC AACATCTACA AGATCCTCCT GCTGCAGGCG TACAGGTTTC ACGCATGCGT | 1320 |
| GCTGCAGCTC CCATTTTCATC AGCAAGTTTG GAAGAACCCC ACATTTTTCC TGCGCGTCAT | 1380 |
| CTCTGACACG GCCTCCCTCT GCTACTCCAT CCTGAAAGCC AAGAACGCAG GTATGTGCAG | 1440 |
| GTGCCTGGCC TCAGTGGCAG CAGTGCCGTC CTGCTGGTGT TAGTGTGTCA GGAGACTGAG | 1500 |
| TGAATCTGGG CTTAGGAAGT TCTTACCCCT TTTCGCATCA GGAAGTGGTT TAACCCAACC | 1560 |
| ACTGTCAGGC TCGTCTGCCC GCCCTCTCGT GGGGTGAGCA GAGCACCTGA TGGAAGGGAC | 1620 |

| | |
|---|------|
| AGGAGCTGTC TGGGAGCTGC CATCCTTCCC ACCTTGCTCT GCCTGGGGAA GCGCTGGGGG | 1680 |
| GCCTGGTCTC TCCTGTTTGC CCCATGGTGG GATTTGGGGG GCCTGGCCTC TCCTGTTTGC | 1740 |
| CCTGTGGTGG GATTGGGCTG TCTCCCGTCC ATGGCACTTA GGGCCCTTGT GCAAACCCAG | 1800 |
| GCCAAGGGCT TAGGAGGAGG CCAGGCCCAG GCTACCCAC CCCTCTCAGG AGCAGAGGCC | 1860 |
| GCGTATCACC ACGACAGAGC CCCGCGCCGT CCTCTGCTTC CCAGTCACCG TCCTCTGCCC | 1920 |
| CTGGACACTT TGTCCAGCAT CAGGGAGGTT TCTGATCCGT CTGAAATTCA AGCCATGTGC | 1980 |
| AACCTGCGGT CCTGAGCTTA ACAGCTTCTA CTTTCTGTTC TTTCTGTGTT GTGGAGACCC | 2040 |
| TGAGAAGGAC CCTGGGAGCT CTGGGAATTT GGAGTGACCA AAGGTGTGC | 2089 |

Patentansprüche

1. Katalytisch aktive humane Telomerase-Untereinheit, ihre funktionellen Äquivalente, ihre Varianten und ihre katalytisch aktiven Fragmente.
5
2. Telomerase gemäß Anspruch 1, enthaltend die Aminosäuresequenz gemäß Abb. 2 oder deren funktionelle Äquivalente.
3. Nucleinsäuresequenzen codierend für Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1 und 2 und ihre funktionellen Äquivalente.
10
4. Nucleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 3, enthaltend die DNA-Sequenz aus Abb. 1 oder ihre funktionellen Äquivalente.
5. Antisense-Nucleinsäuresequenz bindend an die Nucleinsäuresequenz gemäß Anspruch 3 oder 4.
15
6. Antikörper gegen Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2, gegebenenfalls markiert mit einem oder mehreren Markern.
20
7. Verwendung von Nucleinsäuresequenzen gemäß den Ansprüchen 3 und 4 zur Herstellung von Telomerase.
8. Verwendung von Antikörpern gemäß Anspruch 6 zur Diagnose.
25
9. Verwendung von Antikörpern gemäß Anspruch 6 zur Herstellung von Arzneimitteln.
10. Vektor enthaltend eine Nucleinsäuresequenz, insbesondere DNA, gemäß Anspruch 3 und 4.
30
11. Mikroorganismen enthaltend den Vektor gemäß Anspruch 10.

12. Screening Assay zur Auffindung von Modulatoren der humanen Telomerase enthaltend die Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2.
- 5 13. Verfahren zur Herstellung der Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man den Mikroorganismus gemäß Anspruch 11 kultiviert und die Telomerase isoliert.

Fig. 1

- 1 / 15 -

| | | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| GTTTCAGGCA | GCGCTGCGTC | CTGCTGCGCA | CGTGGGAAGC | CCTGGCCCCG | GCCACCCCCG | CGATGCCGCG | 70 |
| CGCTCCCCGC | TGCCGAGCCG | TGCGCTCCCT | GCTGCGCAGC | CACTACCGCG | AGGTGCTGCC | GCTGGCCACG | 140 |
| TTCGTGCGGC | GCCTGGGGCC | CCAGGGCTGG | CGGCTGGTGC | AGCGCGGGGA | CCCGGCGGCT | TTCCGCGCGC | 210 |
| TGGTGGCCCA | GTGCTGCTG | TGCGTGCCCT | GGGACGCACG | GCCGCCCCCC | GCCGCCCCCT | CCTTCCGCCA | 280 |
| GGTGTCTGCT | CTGAAGGAGC | TGGTGGCCCG | AGTGTGTGAG | AGGCTGTGCG | AGCGCGGGCG | GAAGAACGTG | 350 |
| CTGGCCTTCG | GCTTCGCGCT | GCTGGACGGG | GCCCGCGGGG | GCCCCCCCGA | GGCCTTCACC | ACCAGCGTGC | 420 |
| GCAGCTACCT | GCCCAACACG | GTGACCGACG | CACTGCGGGG | GAGCGGGGCG | TGGGGGCTGC | TGCTGCGCCG | 490 |
| CGTGGGCGAC | GACGTGCTGG | TTCACCTGCT | GGCAGCTGCG | GCGTCTTTTG | TGCTGGTGCC | TCCCAGCTGC | 560 |
| GCCTACCAGG | TGTGCGGGCC | GCCGCTGTAC | CAGCTCGGCG | CTGCCACTCA | GGCCCCGGCC | CCGCCACACG | 630 |
| CTAGTGGACC | CCGAAGGCGT | CTGGGATGCG | AACGGGCTTG | GAACCATAGC | GTCAGGGAGG | CCGGGGTCCC | 700 |
| CCTGGGCGCT | CCAGCCCCGG | GTGCGAGGAG | GCGCGGGGGC | AGTGCCAGCC | GAAGTCTGCC | GTTGCCCAAG | 770 |
| AGGCCCAGGC | GTGGCGCTGC | CCCTGAGCCG | GAGCGGACGC | CCGTTGGGCA | GGGGTCTTGG | GCCCACCCGG | 840 |
| GCAGGACGCG | TGACCCGAGT | GACCGTGGTT | TCTGTGTGGT | GTCACCTGCC | AGACCCGCCG | AAGAAGCCAC | 910 |
| CTCTTTGGAG | GGTGCCTCT | CTGGCACGCG | CCACTCCAC | CCATCCGTGG | GCCGCCAGCA | CCAGCGGGGC | 980 |
| CCCCATCCA | CATCGCGGCC | ACCACGTCCC | TGGGACACGC | CTTGTCCTCC | GGTGTACGCC | GAGACCAAGC | 1050 |
| ACTTCTCTA | CTCCTCAGGC | GACAAGGAGC | AGCTGCGGCC | CTCCTTCCTA | CTCAGCTCTC | TGAGGCCAG | 1120 |
| CCTGACTGGC | GCTCGGAGGC | TCGTGGAGAC | CATCTTTCTG | GGTTCCAGGC | CCTGGATGCC | AGGGAATCCC | 1190 |
| CGCAGGTTGC | CCCGCCTGCC | CCAGCGCTAC | TGGCAAATGC | GGCCCCGTGT | TCTGGAGCTG | TCTGGGAACC | 1260 |
| ACGCGCAGTG | CCCTACGGG | GTGCTCCTCA | AGACGCACTG | CCCGCTGCCA | GCTGCGGTCA | CCCCAGCAGC | 1330 |
| CGGTGTCTGT | CCCCGGGAGA | AGCCCCAGGG | CTCTGTGGCG | GGCCCCGAGG | AGGAGGACAC | AGACCCCCGT | 1400 |
| CGCTGGTGCT | AGCTGCTCCG | CCAGCACAGC | AGCCCCCTGG | AGGTGTACGG | CTTCGTGCGG | GCCTGCCTGC | 1470 |
| GCCGCGCTGGT | GGCCCCAGGC | CTCTGGGGCT | CCAGGCACAA | CGAACGCCGC | TTCTCTCAGG | ACACCAAGAA | 1540 |
| GTTCACTCTC | CTGGGGAAGC | ATGCCAAGCT | CTCGCTGCAG | GAGCTGACGT | GGAAGATGAG | CGTGGGGGAC | 1610 |
| TGCGCTTGGC | TGCGCAGGAG | CCCAGGGGTT | GGCTGTGTTT | CGGCCGACAG | GCACCGTCTG | CGTGAGGAGA | 1680 |
| TCCTGGCCAA | GTTCTCTGAC | TGGCTGATGA | GTGTGTACGT | CGTCGAGCTG | CTCAGGTCTT | TCTTTTATGT | 1750 |
| CACGGAGACC | ACGTTTCAAA | AGAACAGGCT | CTTTTTCTAC | CGGAAGAGTG | TCTGGAGCAA | GTTGCAAAGC | 1820 |
| ATTGAATCA | GACAGCACTT | GAAGAGGGTG | CAGCTGCGGG | AGCTGTCCGA | AGCAGAGGTC | AGGCAGCATC | 1890 |
| GGGAAGCCAG | GCCCCCCTTG | CTGACGTCCA | GACTCCGCTT | CATCCCCAAG | CCTGACGGGC | TGCGGCCGAT | 1960 |
| TGTGAACATG | GACTACGTCG | TGGGAGCCAG | AACGTTCCCG | AGAGAAAAGA | GGGCCGAGCG | TCTCACCTCG | 2030 |
| AGGGTGAAGG | CACTGTTTCA | CGTGCTCAAC | TACGAGCGGG | CGCGCGCGCC | CGGCCCTCTG | GGCCCTCTCTG | 2100 |
| TGCTGGGCTT | GGACGATATC | CACAGGGCCT | GGCGCACCTT | CGTGCTGCGT | GTGCGGGCCC | AGGACCCGCC | 2170 |
| GCCTGAGCTG | TACTTTGTCA | AGGTGGATGT | GACGGGCGCG | TACGACACCA | TCCCCCAGGA | CAGGCTCACG | 2240 |
| GAGGTCATCG | CCAGCATCAT | CAAAACCCAG | AACACGTAAT | GCGTGCGTCG | GTATGCCGTG | GTCCAGAAGG | 2310 |
| CCGCCCATGG | GCACGTCCGC | AAGGCCTTCA | AGAGCCACGT | CTCTACCTTG | ACAGACCTCC | AGCCGTACAT | 2380 |
| GCGACAGTTC | GTGGCTCACC | TGCAGGAGAC | CAGCCCCTG | AGGGATGCCG | TCGTATCGA | GCAGAGCTCC | 2450 |
| TCCCTGAATG | AGGCCAGCAG | TGGCCTCTTC | GACGTCTTCC | TACGCTTCAT | GTGCCACCAC | GCCGTGCGCA | 2520 |
| TCAGGGGCAA | GTCTTACGTC | CAGTGCCAGG | GGATCCCGCA | GGGCTCCATC | CTCTCCACGC | TGCTCTGCAG | 2590 |
| CCTGTGCTAC | GGCGACATGG | AGAACAAGCT | GTTTGCGGGG | ATTCCGGCGG | ACGGGCTGCT | CCTGCGTTTG | 2660 |
| GTGGATGATT | TCTTGTGGT | GACACCTCAC | CTCACCCACG | CGAAAACCTT | CCTCAGGACC | CTGGTCCGAG | 2730 |
| GTGTCCCTGA | GTATGGCTGC | GTGGTGAAT | TGCGGAAGAC | AGTGGTGAAC | TTCCCTGTAG | AAGACGAGGC | 2800 |
| CCTGGGTGGC | ACGGCTTTTG | TTCAGATGCC | GGCCACGGCC | CTATTCCCTT | GGTGCGGCCT | GCTGCTGGAT | 2870 |
| ACCCGAGCCC | TGGAGGTGCA | GAGCGACTAC | TCCAGCTATG | CCCGGACCTC | CATCAGAGCC | AGTCTCACCT | 2940 |
| TCAACCGCGG | CTTCAAGGCT | GGGAGGAACA | TGCGTCGCAA | ACTCTTTGGG | GTCTTGCGGC | TGAAGTGTCA | 3010 |
| CAGCCTGTTT | CTGGATTTGC | AGGTGAACAG | CCTCCAGACG | GTGTGCACCA | ACATCTACAA | GATCCTCCTG | 3080 |
| CTGCAGGCGT | ACAGGTTTCA | CGCATGTGTG | CTGCAGCTCC | CATTTTCATCA | GCAAGTTTGG | AAGAACCCCA | 3150 |
| CATTTTTCCT | GCGCGTCATC | TCTGACACGG | CCTCCCTCTG | CTACTCCATC | CTGAAAGCCA | AGAACGCAGG | 3220 |
| GATGTGCTG | GGGGCCAAGG | GCGCGCGCGG | CCCTCTGCCC | TCCGAGGCCG | TGCAGTGGCT | GTGCCACCAA | 3290 |
| GCATTCCTGC | TCAAGCTGAC | TGACACCGT | GTCACCTACG | TGCCACTCCT | GGGGTCACTC | AGGACAGCCC | 3360 |
| AGACGCAGCT | GAGTCGGAAG | CTCCCGGGGA | CGACGCTGAG | TGCCCTGGAG | GCCGCAGCCA | ACCCGCACT | 3430 |
| GCCCTCAGAG | TTCAAGACCA | TCCTGGACTG | ATGGCCACCC | GCCACAGACC | AGGCCGAGAG | CAGACACCAG | 3500 |
| CAGCCTCTGT | ACGCGGGGCT | CTACGTCCCA | GGGAGGGAGG | GGCGGCCAC | ACCCAGGCC | GCACCGCTGG | 3570 |
| GAGTCTGAGG | CCTGAGTGAG | TGTTTGGCCG | AGGCCTGCAT | GTCCGGCTGA | AGGCTGAGTG | TCCGGCTGAG | 3640 |
| GCCTGAGCGA | GTGTCCAGCC | AAGGGCTGAG | TGTCCAGCAC | ACCTGCCGTC | TTCATTTCCT | CACAGGCTGG | 3710 |
| CGCTCGGCTC | CACCCAGGG | CCAGCTTTTC | CTCACCAGGA | GCCCGGCTTC | CACTCCCCAC | ATAGGAATAG | 3780 |
| TCCATCCCCA | GATTCCGCAT | TGTTACCCCC | TCGCCCTGCC | CTCCTTTGCC | TTCCACCCCC | ACCATCCAGG | 3850 |
| TGGAGACCCT | GAGAAGGACC | CTGGGAGCTC | TGGGAATTTG | GAGTGACCAA | AGGTGTGCC | TGTACACAGG | 3920 |
| CGAGGACCCT | GCACCTGGAT | GGGGTCCCT | GTGGGTCAAA | TTGGGGGGAG | GTGCTGTGGG | AGTAAATAC | 3990 |
| TGAATATATG | AGTTTTTTCAG | TTTTGAAAAA | AAAAAAAAAA | AAAAAAAAAA | AA | | 4042 |

- 2 /15 -

Fig. 2

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| MPRAPRCRAV | RSLLRSHYRE | VLPLATFVRR | LGPQGWRLVQ | RGDPAAFRAL | 50 |
| VAQCLVCVPW | DARPPPAAPS | FRQVSCLKEL | VARVLQRLCE | RGAKNVLAFG | 100 |
| FALLDGARGG | PPEAFTTSVR | SYLPNTVTDA | LRGSGAWGLL | LRRVGDDVLV | 150 |
| HLLARCALFV | LVAPSCAYQV | CGPPLYQLGA | ATQARPPPHA | SGPRRRLGCE | 200 |
| RAWNHSVREA | GVPLGLPAPG | ARRRGGSASR | SLPLPKRPRR | GAAPEPERTP | 250 |
| VGQGSWAHPG | RTRGPSDRGF | CVVSPARPAE | EATSLEGALS | GTRHSHPSVG | 300 |
| RQHHAGPPST | SRPPRPWDTP | CPPVYAETKH | FLYSSGDKEQ | LRPSFLLSSL | 350 |
| RPSLTGARRL | VETIFLGSRP | WMPGTPRRLP | RLPQRYWQMR | PLFLELLGNH | 400 |
| AQCPYGVLLK | THCPLRAAVT | PAAGVCAREK | PQGSVAAPEE | EDTDPRRLVQ | 450 |
| LLRQHSSPWQ | VYGFVRACLR | RLVPPGLWGS | RHNERRFLRN | TKKFISLGKH | 500 |
| AKLSLQELTW | KMSVRDCAWL | RRSPGVGCVP | AAEHLREEI | LAKFLHWLMS | 550 |
| VYVVELLRSF | FYVTETTFQK | NRLFFYRKSV | WSKLQSIGIR | QHLKRVQLRE | 600 |
| LSEAEVRQHR | EARPALLTSR | LRFIPKPDGL | RPIVNMDYVV | GARTFRREKR | 650 |
| AERLTSRVKA | LFSVLNYERA | RRPGLLGASV | LGLDDIHRAW | RTFVLRVRAQ | 700 |
| DPPPELYFVK | VDVTGAYDTI | PQDRLTEVIA | SIKPKQNTYC | VRRYAVVQKA | 750 |
| AHGHVRKAFK | SHVSTLTDLQ | PYMRQFVAHL | QETSPLRDAV | VIEQSSSLNE | 800 |
| ASSGLFDVFL | RFMCHHAVRI | RGKSYVQCQG | IPQGSILSTL | LCSLCYGDME | 850 |
| NKLFAGIRRD | GLLLRLVDDF | LLVTPHLTHA | KTFLRTLVRG | VPEYGCVVNL | 900 |
| RKTVVNFPVE | DEALGGTAFV | QMPAHGLFPW | CGLLLDTRTL | EVQSDYSSYA | 950 |
| RTSIRASLTF | NRGFKAGRNM | RRKLFGVLRL | KCHSLFLDLQ | VNSLQTVCTN | 1000 |
| IYKILLQAY | RFHACVLQLP | FHQQVWKNPT | FFLRVISDTA | SLCYSILKAK | 1050 |
| NAGMSLGAKG | AAGPLPSEAV | QWLCHQAFLL | KLTRHRVTYV | PLLGSLRTAQ | 1100 |
| TQLSRKLPGT | TLTALEAAAN | PALPSDFKTI | LD | | 1132 |

- 3/15 -

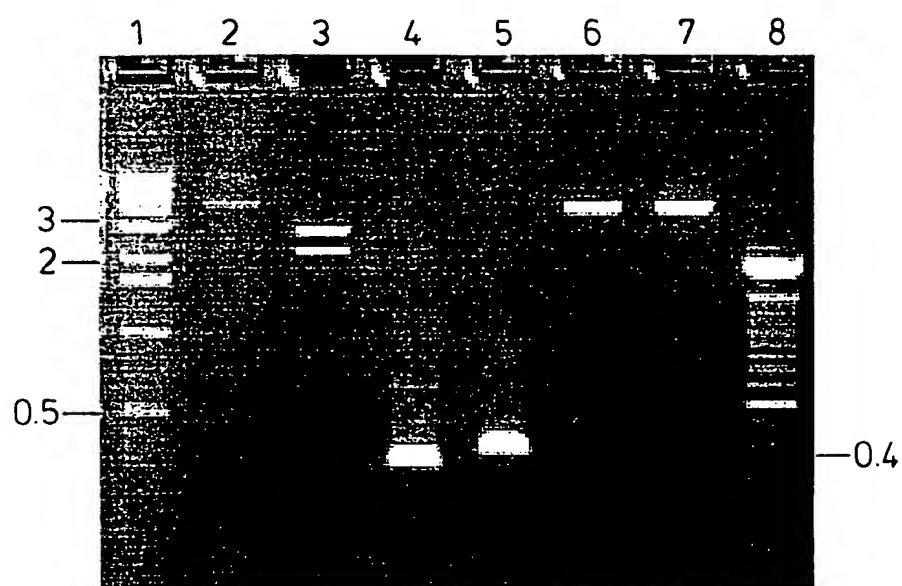
Fig. 3

Fig. 4

Lipman-Pearson Protein Alignment

Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12

Seq1(1>129)

Seq2(1>150)

Similarity

Gap

Gap

Consensus

Length

Length

Length

Length

| PHTC.PRO | P123.PRO | Index | Number | Gap | Length | Consensus | Length |
|----------|--|-------|--------|-----|--------|-----------|----------|
| (2>124) | (1>117) | 31.5 | 4 | 6 | 123 | | |
| PHTC.PRO | KFLHWMVYVVELLSFFYVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLSQSIGIRQHLKRVQLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 70 80 |
| | K:L:W:.. VV.L:R.FFYVTE ..:YRK:W.:...I.:LK: L:V E EV ...:..:LR | | | | | | |
| P123.PRO | KLLRWIFEDLVVSLIRCFYVTEQKSYSKTYYYRKNIDVIMKMSI-ADLKKETLAEVQEKV-EEWKKSGLGFAPGKLR | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 70 |
| | | | | | | | |
| PHTC.PRO | FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVSLNYERA | 90 | 100 | 110 | 120 | | |
| | :IPK...:RPI M.: .:.....:LI:...K L S L | | | | | | |
| P123.PRO | LIPKKTTFRPI--MTF--NKKIVNSDRKTTKLTNTKLLNSHMLKTL | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | |

Fig. 5

Lipman-Pearson Protein Alignment

Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12

Seq1(1>150) Seq2(1>150) Similarity Gap

P123.PRO EST2P.PRO Index Number Length Consensus

| (2>148) | | (1>146) | | 21.6 | 4 | 5 | 149 |
|-----------|---|---------|------|------|------|------|-------------|
| P123.PRO | LLRWIFEDLVVSLIRCFYVTEQ0KSYSKYTYRKNIDVIMKMSIADLKKETLAEVOEKEVEEWWKSLGFA PGKLR LIP | ↖10 | ↖20 | ↖30 | ↖40 | ↖50 | ↖60 ↖70 ↖80 |
| EST2P.PRO | FISWLFROLIPKIIOTFFCYCTEISSVTIVYF-RHDTWNLITPFIVEYFKTYLVENNVCRNHNSTLSNFNHSMRIIP | ↖10 | ↖20 | ↖30 | ↖40 | ↖50 | ↖60 ↖70 ↖80 |
| P123.PRO | KKT--TFRPIMTFNKKI VNSDRKTTKLITNTKLLNSHLMKTLKNRMFKDPFGFAVFNYYDDVMKKYEEFVC | ↖90 | ↖100 | ↖110 | ↖120 | ↖130 | ↖140 ↖150 |
| EST2P.PRO | KK:FR I : : : : K : : : : : L: L: N: : : : : F: : : : : : : : : : : EF | ↖90 | ↖100 | ↖110 | ↖120 | ↖130 | ↖140 ↖150 |
| EST2P.PRO | KKSNNEFR I I AIPCRGADEEEFTIYKENHKNAIQPTOKILEYLRNKR-PTSFT-KIYSPTQIADRIKEFKO | ↖80 | ↖90 | ↖100 | ↖110 | ↖120 | ↖130 ↖140 |

Fig. 6

Lipman-Pearson Protein Alignment

Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12

Seq1(1>129)

Seq2(1>150)

Gap

Consensus

Length

Length

Index

Number

Gap

Length

Consensus

Length

Index

Number

Gap

Length

Consensus

Length

Index

Number

Gap

Length

Consensus

Length

Index

Number

Gap

Length

Consensus

Length

Index

Number

| | | | | | |
|-----------|---|------|------|------|------|
| (3>85) | (1>80) | 23.3 | 3 | 3 | 83 |
| PHTC.PRO | FLHWLMSVYVVELLSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIRQHLKRVQLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLRF | ↖10 | ↖20 | ↖30 | ↖40 |
| EST2P.PRO | FISWLFROLIPKIIQTFFYCTEIS-STVTIVYFRHDTWKNLITPFIVEYFKTY-LVE-NNVCRNHNSTYLSNFNHSMRI | ↖10 | ↖20 | ↖30 | ↖40 |
| PHTC.PRO | IPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA | ↖90 | ↖100 | ↖110 | ↖120 |
| EST2P.PRO | IPKKSNNEFRIIAIPCRGADEEEFTIYKENHKNAIOPTOKILEYLRN | ↖80 | ↖90 | ↖100 | ↖110 |

Alignment Workspace of Untitled, using Clustal method with PAM250 residue weight table

| | 00 | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 |
|------------|------------|----|----|----|----|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 50245 0000 | | | | | -KFLXWLFXXLLVVLIRXFFVVTXXXXXXSYRKKXXWKLXXXXIXXXLKKXXLXXVXEXEVRXHXHXXLX-FXXS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PHTC. PRO | | | | | | AKFLHWLMSVYVVELLRSEFFVVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIROHLKRVLQRDVSEAEVRQHREARPA-LLTS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P123. PRO | | | | | | -KLLRWIFEDLVSLIRCFYVTEQKSYKTYRKNLWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVQEKEV-EEWKKSIG-FAPG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EST2P. PRO | | | | | | --FISWLFRLQIPKIIQTFYFCTEIS-STVTIVYFRHDTWNKLITPFIVEYFKTYL---VENNVCRNHNSYTLNENHS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 50245 0000 | | | | | LRXIPKXXX--FRPIXXXXXXXXXXX--TXXXXXXXLTXXXXLX---XLXXXXXXXXFXXX--FSVXNYDXDXXXXXX | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PHTC. PRO | | | | | | LRFIPKPDG--LRPIVNM DYVGAR---TFRREKRAERLTSRVKAL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | -----FSVLNYERA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P123. PRO | | | | | | LRLIPKKT--FRPIMTFN---KK---IVNSDRKTTKLTTNTKLNSHMLKTLKNRMFKDPFGFAVFNYDDVMKKYE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EST2P. PRO | | | | | | MRIIPKKSNNFR-IIAIPCRGADEEFTIYKENHKNALIOPTQKILE---YLRNKRPTSFTKI--YSPTQIADRIKEFK | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

- 8 / 15 -

Fig. 8

| | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| GTGCCTGCAG | AGACCCGTCT | GGTGCACTCT | GATTCTCCAC | TTGCCTGTTG | CATGTCCTCG | TTCCCTTGTT | 70 |
| TCTCACCACC | TCTTGGGTTG | CCATGTGCGT | TTCCTGCCGA | GTGTGTGTTG | ATCCTCTCGT | TGCCTCCTGG | 140 |
| TCACTGGGCA | TTTGCTTTTA | TTTCTCTTTG | CTTAGTGTTA | CCCCCTGATC | TTTTTATTGT | CGTTGTTTGC | 210 |
| TTTTGTTTAT | TGAGACAGTC | TCACTCTGTC | ACCCAGGCTG | GAGTGTAATG | GCACAATCTC | GGCTCACTGC | 280 |
| AACCTCTGCC | TCCTCGGTTT | AAGCAGTTCT | CATTCTCAA | CCTCATGAGT | AGCTGGGATT | ACAGGCGCCC | 350 |
| ACCACCACGC | CTGGCTAATT | TTTGTAATTT | TAGTAGAGAT | AGGCTTTCAC | CATGTTGGCC | AGGCTGGTCT | 420 |
| CAAACCTCTG | ACCTCAAGTG | ATCTGCCCCG | CTTGGCCTCC | CACAGTGCTG | GGATTACAGG | TGCAAGCCAC | 490 |
| CGTGCCCCGG | ATACCTTGAT | CTTTTAAAT | GAAGTCTGAA | ACATTGCTAC | CCTTGTCTG | AGCAATAAGA | 560 |
| CCCTTAGTGT | ATTTTAGCTC | TGGCCACCCC | CCAGCCTGTG | TGCTGTTTTC | CCTGCTGACT | TAGTTCATC | 630 |
| TCAGGCATCT | TGACACCCCC | ACAAGCTAAG | CATTATTAAT | ATTGTTTTCC | GTGTTGAGTG | TTTCTTTAGC | 700 |
| TTTGCCCCCG | CCCTGCTTTT | CCTCCTTTGT | TCCCCGCTG | TCTTCTGTCT | CAGGCCCGCC | GTCTGGGGTC | 770 |
| CCCTTCCTTG | TCCTTTGCGT | GGTTCTTCTG | TCTTGTATT | GCTGGTAAAC | CCCAGCTTTA | CCTGTGCTGG | 840 |
| CCTCCATGGC | ATCTAGCGAC | GTCCGGGGAC | CTCTGCTTAT | GATGCACAGA | TGAAGATGTG | GAGACTCACG | 910 |
| AGGAGGGCGG | TCATCTTGGC | CCGTGAGTGT | CTGGAGCACC | ACGTGGCCAG | CGTTCCTTAG | CCAGGGTTGG | 980 |
| CTGTGTTCCG | GCCGCAGAGC | ACCGTCTGCG | TGAGGAGATC | CTGGCCAAGT | TCCTGCACTG | GCTGATGAGT | 1050 |
| GTGTACGTCG | TCGAGCTGCT | CAGGTCTTTC | TTTTATGTCA | CGGAGACCAC | GTTTCAAAG | AACAGGCTCT | 1120 |
| TTTTCTACCG | GAAGAGTGTC | TGGAGCAAGT | TGC | | | | 1153 |

Fig. 9

| | | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| CAGAGCCCTG | GTCCTCCTGT | CTCCATCGTC | ACGTGGGCAC | ACGTGGCTTT | TCGCTCAGGA | CGTCGAGTGG | 70 |
| ACACGGTGAT | CTCTGCCCTCT | GCTCTCCCTC | CTGTCCAGTT | TGCATAAACT | TACGAGGTTT | ACCTTCACGT | 140 |
| TTTGATGGAC | ACGCGGTTTC | CAGGCACCGA | GGCCAGAGCA | GTGAACAGAG | GAGGCTGGGC | GCGGCAGTGG | 210 |
| AGCCGGGTTG | CCGGCAATGG | GGAGAAGTGT | CTGGAAGCAC | AGACGCTCTG | GCGAGGGTGC | CTGCAGAGAC | 280 |
| CCGCTGGTG | CACCTGATT | CTCCACTTGC | CTGTTGCATG | TCCTCGTTCC | CTTGTTTCTC | ACCACCTCTT | 350 |
| GGGTGCCAT | GTGCGTTTCC | TGCCGAGTGT | GTGTTGATCC | TCTCGTTGCC | TCCTGGTCAC | TG | 412 |

Fig. 10

| | | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| GGGGTCCTGG | GCCCCACCGG | GCAGGACGCG | TGGACCGAGT | GACCGTGGTT | TCTGTGTGGT | GTCACCTGCC | 70 |
| AGACCCGCGG | AAGAAGCCAC | CTCTTTGGAG | GGTGCGCTCT | CTGGCACGCG | CCACTCCCAC | CCATCCGTGG | 140 |
| GCGCCAGCA | CCACGCGGGC | CCCCATCCA | CATCGCGGCC | ACCACGTCCC | TGGGACACGC | CTTGTCCCCC | 210 |
| GGTGACGCC | GAGACCAAGC | ACTTCCTCTA | CTCCTCAGGC | GACAAGGAGC | AGCTGCGGcC | CTCCTTCCTA | 280 |
| CTCAGCTCTC | TGAGGCCCGAG | CCTGACTGGC | GCTCGGAGGC | TCGTGGAGAC | CATCTTTCTG | GGTTCCAGGC | 350 |
| CCTGGATGCC | AGGGACTCCC | CGCAGGTTGC | CCCGCTGCC | CCAGCGCTAC | TGGCAAATGC | GGCCCCGTGT | 420 |
| TCTGGAGCTG | CTTGGGAACC | ACGCGCAGTG | CCCCTACGGG | GTGCTCCTCA | AGACGCACTG | CCCGCTGCGA | 490 |
| GCTGCGGTCA | CCCCAGCAGC | CGGTGTCTGT | GCCCCGGAGA | AGCCCCAGGG | CTCTGTGGCG | GCCCCCGAGG | 560 |
| AGGAGGACAC | AGACCCCCGT | CGCCTGGTGC | AGCTGCTCCG | CCAGCACAGC | AGCCCCCTGGC | AGGTGTACGG | 630 |
| CTTCGTGCGG | GCCTGCCTGC | GCCGGCTGGT | GCCCCCAGGC | CTCTGGGGCT | CCAGGCACAA | CGAACGCCGC | 700 |
| TTCTCAGGA | ACACCAAGAA | GTTTATCTCC | CTGGGAAGC | ATGCCAAGCT | CTCGCTGCAG | GAGCTGACGT | 770 |
| GGAAGATGAG | CGTGCGGGAC | TGCGCTTGGC | TGCGCAGGAG | CCCAGGTGAG | GAGGTGGTGG | CCGTCGAGGG | 840 |
| CCCAGGCCCC | AGAGCTGAAT | GCAGTAGGGG | CTCAGAAAAG | GGGGCAGGCA | GAGCCCTGGT | CCTCCTGTCT | 910 |
| CCATCGTCAC | GTGGGCACAC | GTGGCTTTTC | GCTCAGGACG | TCGAGTGGAC | ACGGTGATCT | CTGCCTCTGC | 980 |
| TCTCCCTCCT | GTCCAGTTTG | CATAAACTTA | CG | | | | 1012 |

- 9/15 -

Fig. 11

```

GAATTCGCGG CCGCGTCGAC GTTTCAGGCA GCGCTGCGTC CTGCTGCGCA CGTGGGAAGC CCTGGCCCCG 70
GCCACCCCCG CGATGCCGCG CGCTCCCCGC TGCCGAGCCG TGCGCTCCCT GCTGCGCAGC CACTACCGCG 140
AGGTGCTGCC GCTGGCCACG TTCGTGCGGC GCCTGGGGCC CCAGGGCTGG CGGCTGGTGC AGCGCGGGGA 210
CCCGGCGGCT TTCCGCGCGC TGGTGGCCCA GTGCTGGTGC TGCGTGCCCT GGGACGCACG GCCGCCCCCC 280
GCCGCCCCCT CCTTCCGCCA GGTGTCCTGC CTGAAGGAGC TGGTGGCCCC AGTGCTGCAG AGGCTGTGCG 350
AGCGCGGCGC GAAGAACGTG CTGGCCTTCG GCTTCGCGCT GCTGGACGGG GCCCGCGGGG GCCCCCCCGA 420
GGCCTTCACC ACCAGCGTGC GCAGTACCT GCCCAACACG GTGACCGACG CACTGCGGGG GAGCGGGGCG 490
TGGGGGCTGC TGCTGCGCCG CGTGGGCGAC GACGTGCTGG TTACCTGCT GGCACGCTGC GCGCTCTTTG 560
TGCTGGTGGC TCCCAGCTGC GCCTACCAGG TGTGCGGGCC GCCGTGTAC CAGCTCGGCG CTGCCACTCA 630
GGCCCCGGCC CCGCCACACG CTAGTGGACC CCGAAGGCGT CTGGGATGCG AACGGGCCTG GAACCATAGC 700
GTCAGGGAGG CCGGGGTCCC CCTGGGCCTG CCAGCCCCGG GTGCGAGGAG GCGCGGGGGC AGTGCCAGCC 770
GAAGTCTGCC GTTGCCCAAG AGGCCCAGGC GTGGCGCTGC CCCTGAGCCG GAGCGGACGC CCGTTGGGCA 840
GGGGTCTCTG GCCCACC CGCAGACGCG TGGACCGAGT GACCGTGTT TCTGTGTGTT GTCACCTGCC 910
AGACCCGCGC AAGAAGCCAC CTCCTTGGAG GGTGCGCTCT CTGGCACGCG CCACTCCAC CCATCCGTGG 980
GCCGCCAGCA CCACGCGGGC CCCCACATCCA CACGCGGCC ACCACGTCCC TGGGACACGC CTGTCCCCC 1050
GGTGTACGCC CCAGCAAGC ACTTCTCTA CTCCTCAGGC GACAAGGAGC AGCTGCGGCC CTCCTTCTTA 1120
CTCAGTCTCT TGAGGCCAG CCTGACTGGC GCTCGGAGGC TCGTGAGAC CATCTTTCTG GGTTCAGGC 1190
CCTGGATGCC AGGGACTCCC CGCAGGTTGC CCCGCTGCC CCAGCGCTAC TGGCAAATGC GGCCCCGTGT 1260
TCTGGAGCTG CTTGGGAACC ACGCGCAGTG CCCCTACGGG GTGCTCCTCA AGACGCACTG CCCGCTGCGA 1330
GCTGCGGTCA CCCAGCAGC CGGTGTCTGT GCCCGGGAGA AGCCCCAGGG CTCTGTGGCG GCCCCGAGG 1400
AGGAGGACAC AGACCCCGT CGCCTGGTGC AGTGCTCCG CCAGCACAGC AGCCCCCTGG AGGTGTACGG 1470
CTTCGTGCGG GCCTGCCTGC GCCGCTGGT GCCCCAGGC CTCTGGGGCT CCAGGCACAA CGAACGCCGC 1540
TTCCTCAGGA ACACCAAGAA GTTCATCTCC CTGGGGAAGC ATGCCAAGCT CTCGCTGCAG GAGCTGACGT 1610
GGAAGATGAG CGTGCGGGAC TGCGCTTGGC TGCGCAGGAG CCCAGGTGAG GAGGTGGTGG CCGTCGAGGG 1680
CCCAGGCCCC AGAGCTGAAT GCAGTAGGGG CTCAGAAAAG GGGGCAGGCA GAGCCCTGGT CCTCCTGTCT 1750
CCATCGTCAC GTGGGCACAC GTGGCTTTTC GCTCAGGACG TCGAGTGGAC ACGGTGATCT CTGCCTCTGC 1820
TCTCCCTCCT GTCCAGTTTG CATAACTTA CGAGGTTCAC CTTACGTTT TGATGGACAC GCGGTTTCCA 1890
GGCGCCGAGG CCAGAGCAGT GAACAGAGGA GGCTGGGCGC GGCAGTGGAG CCGGGTTGCC GGCAATGGGG 1960
AGAAGTGTCT GGAAGCACAG ACGCTCTGGC GAGGTTGCCT GCAGGGGTTG GCTGTGTTCC GGCCGAGAG 2030
CACCGTCTGC GTGAGGAGAT CCTGGCCAAG TTCCTGCAT GGCTGATGAG TGTGTACGTC GTCAGAGTGC 2100
TCAGGTCTTT CTTTTATGTC ACGGAGACCA CGTTTCAAAA GAACAGGCTC TTTTCTACC GGAAGAGTGT 2170
CTGGAGCAAG TTGCAAGCA TTGGAATCAG ACAGCACTTG AAGAGGGTGC AGCTGCGGGA GGTGTGCGAA 2240
GCAGAGGTCA GGCAGCATCG GGAAGCCAGG CCCGCCCTGC TGACGTCCAG ACTCCGCTTC ATCCCCAAGC 2310
CTGACGGGCT GCGGCCGATT GTGAACATGG ACTACGTCGT GGGAGCCAGA ACGTTCCGCA GAGAAAAGAG 2380
GGTGGCTGTG CTTTGGTTTA ACTTCCTTTT TAAACAGAAG TGCGTTTGAG CCCACATTT GGTATCAGCT 2450
TAGATGAAGG GCCCGGAGGA GGGGCCACGG GACACAGCCA GGGCCATGGC ACGGCGCCAA CCCATTTGTG 2520
CGCACGGTGA GGTGGCCGAG GTGCCGGTGC CTCAGAAAA GCAGCGTGGG GGTGTAGGGG GAGCTCCTGG 2590
GGCAGGGACA GGCTCTGAGG ACCACAAGAA GCAGCTGGGC CAGGGCCTGG ATGCAGCACG GCCCGAGCGG 2660
GTGGGGGGCC ACCACGCCAT TCTGGTCAAA GGTGTGTAG TCGTAATAGC CGGCCAGGC GCTCTGAACC 2730
TTCAGAGTCT CAAAAGCTGG GACCTCAGG GCCAAATGGG GCCACACCTT GTCCTGGAAG AAATCATGGT 2800
CCACTTCCAG GTTCGCCGGG TCCGGTTCTT CTGCTCAGT GGGGCTACGA CCACCTAGGT AGTTGCTACC 2870
TAATCCTTCC CGGCGAAAAAT AGGCTCCACT GGTGTCTGCA ACAAGCGGAG TCTCTAGGCC TGGTCCCTGG 2940
GGGCAGTGCC ACACATACAC ATACCTTTTC CTCGGCTCCA CAGGTAGCTT GGTGCCCTCG AGGGTGCCAG 3010
GCGGCCCTCC TCCAACACCA GCCAGTCTGC CGATTTCGCG AGACAGGCT CCGGCTGCGT TGATCACAAT 3080
GGCGCATTCC ACAGGCTGGT ACTCAGGCT CCGGTCCATC TTCACATGGA CTTTCATGGAT CCTTTTCAAG 3150
ACCACCGCTT TGTCATCTGT GGTCAACATG CGTTGAGATG AAGAGACAAA ACGTGTACCC TCTCCCTGGC 3220
AGAAAAGGAC TCCCAAGGAC TGGACCTTTC GCCGAAGCCC CTGGAGCAGA CACCAGGGGT CAAACCAACC 3290
TTCGTCTCTC ATCCCATAGG ACGCCAAAGC CACTCCCTCT GTGTTTATCC AGGGAACTT GTTCCGAAGC 3360
TGATCAGGAG ACATCAGAGA AACTTTGGCT CCCTCCTGCC TCTGCACTTT CACGTTGCTC TCCATGGCTG 3430
CAGCATCCTT TTCTGAAGCC AGCAAGAGGT AGCCCGAGGG GTTGAACCGG AGGTCCAGGG GAGGAGCATC 3500
GACTACGGCC AGGTACTCAT TGATGTTCCG TAGAAAGCTG GCTGAAAAGA GGGAGAGCTG GATGTTCTCA 3570
GGCAATGAGA ACTGCTGACA AATCCACCT ACTGAGAGCC CAGTGAGGGC CTGTGAATAC GTGTGGTCCC 3640
GTTCCACCAC TAGCACTCGA ATAGCACCTC GTCTGCTCTC CAGCTTCTTC AGCCAATAGG CCACAGACAA 3710
GCCAAGCACC CCACCTCCA CGATCACCAC ATCCGAGTGC TCGGGAGGCA GGTGGCTGGT GTCTTGCACT 3780
AGATCACAGG ACCTTCCAGG CAGGATCGAC TTGATCTTCT TCTTAATCTC AGACACCTTT CCATCCCAGT 3850
CCAGAGAAAA GCCTCCTCTG CGCGTGCCTG GCCTCCGGGT CAAGAGGCCC CGGCCCATGC CGTGCGGCAG 3920
AACCTCCGA ATCATAGCCC CTCTGAGCCC GGTGCGACGC GGCCGCGAAT TC 3972

```

- 10/15 -

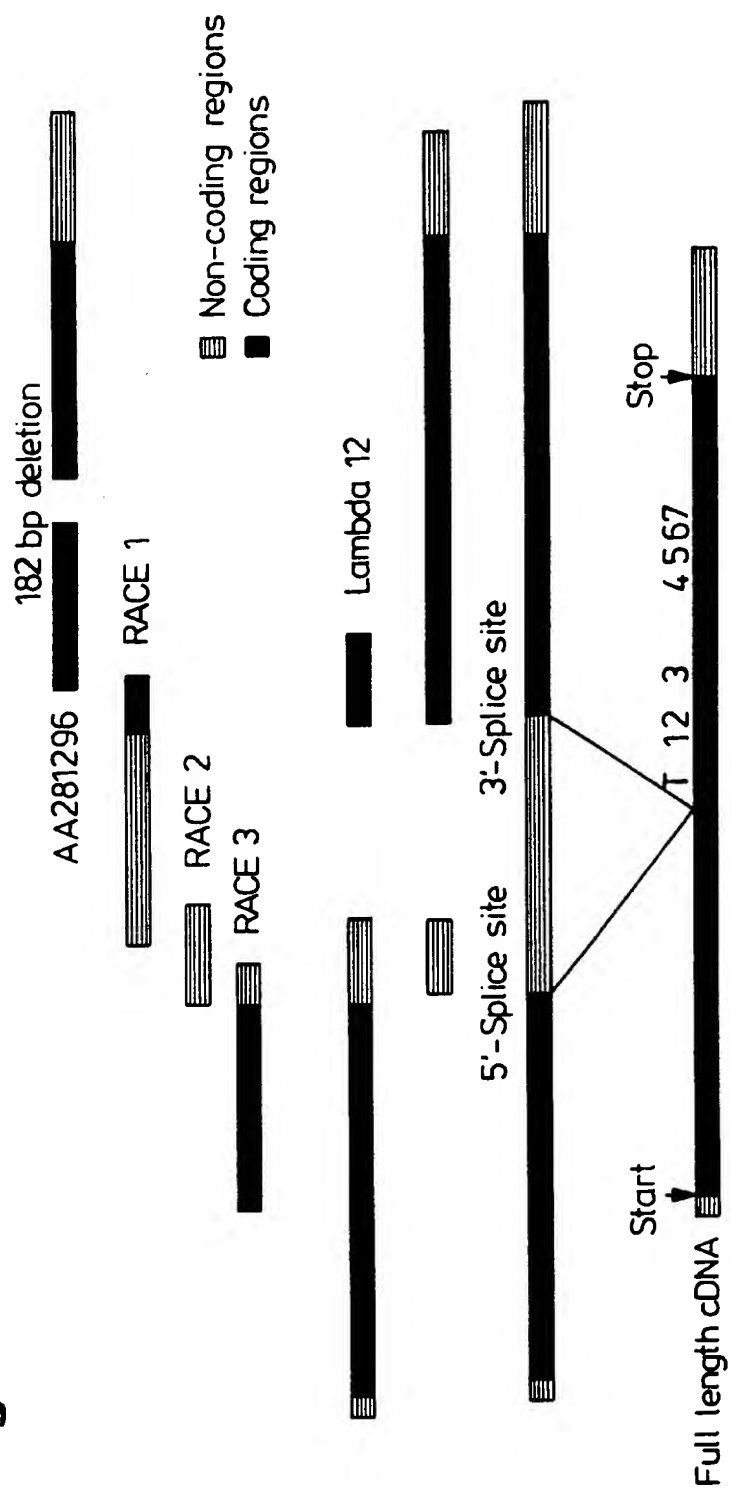
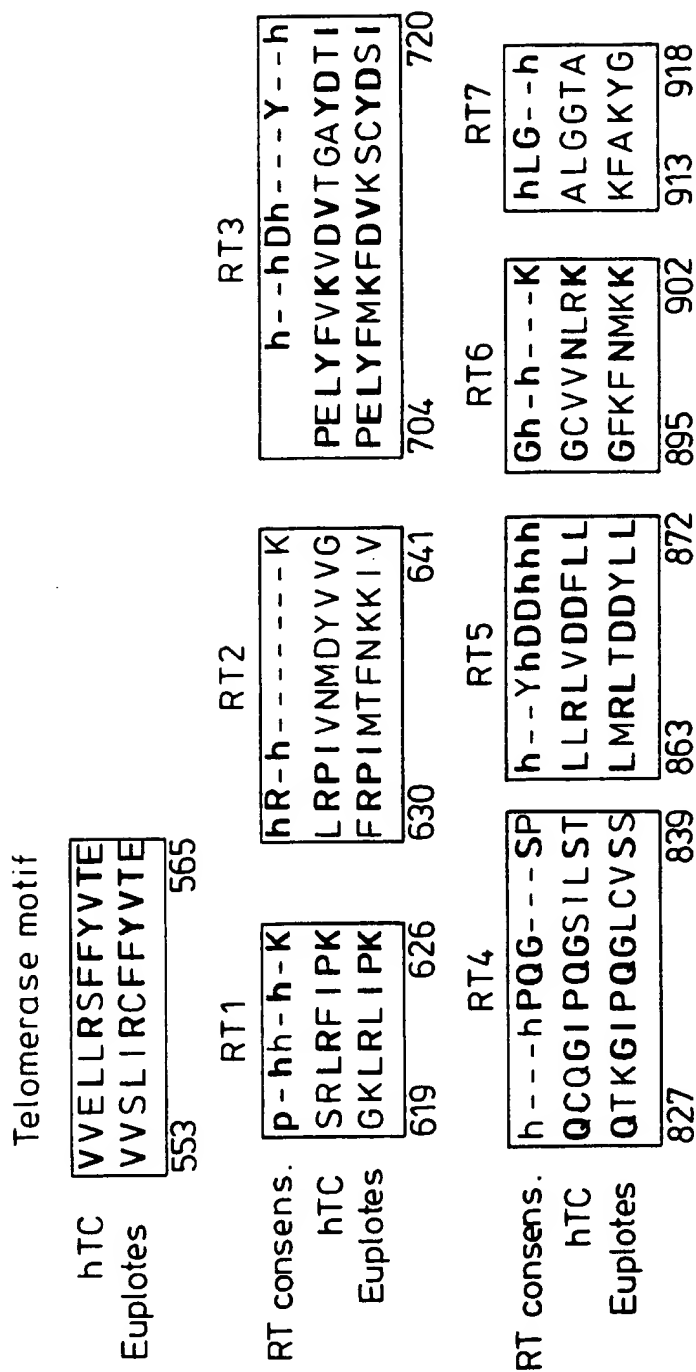
Fig.12

Fig.13



- 12 / 15 -

Fig. 14

| | | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| CCGGAAGAGT | GTCTGGAGCA | AGTTGCAAAG | CATTGGAATC | AGACAGCACT | TGAAGAGGGT | GCAGCTGCGG | 1853 |
| GAGCTGTCCG | AAGCAGAGGT | CAGGCAGCAT | CGGGAAGCCA | GGCCCCCCT | GCTGACGTCC | AGACTCCGCT | 1923 |
| TCATCCCCAA | GCCTGACGGG | CTGCGGCCGA | TTGTGAACAT | GGACTACGTC | GTGGGAGCCA | GAACGTTCGG | 1993 |
| CAGAGAAAAG | AGGGCCGAGC | GTCTCACCTC | GAGGGTGAAG | GCACTGTTCA | GCGTGCTCAA | CTACGAGCGG | 2063 |
| GCGCGGCGCC | CCGGCCTCCT | GGGCGCCTCT | GTGCTGCGCC | TGGACGATAT | CCACAGGGCC | TGGCGCACCT | 2133 |
| TCGTGCTGCG | TGTGCGGGCC | CAGGACCCGC | CGCCTGAGCT | GTACTTTGTC | AAGGTGGATG | TGACGGGCGC | 2203 |
| GTACGACACC | ATCCCCCAGG | ACAGGCTCAC | GGAGGTCATC | GCCAGCATCA | TCAAACCCCA | GAACACGTAC | 2273 |
| TGCGTGCGTC | GGTATGCCGT | GGTCCAGAAG | GCCGCCCATG | GGCACGTCCG | CAAGGCCTTC | AAGAGCCACG | 2343 |
| TCTCTACCTT | GACAGACCTC | CAGCCGTACA | TGCGACAGTT | CGTGGCTCAC | CTGCAGGAGA | CCAGCCCGCT | 2413 |
| GAGGGGTGCC | GTGCTCATCG | AGCAGAGCTC | CTCCCTGAAT | GAGGCCAGCA | GTGGCCTCTT | CGAGCTCTTC | 2483 |
| CTACGCTTCA | TGTGCCACCA | CGCCGTGCGC | ATCAGGGGCA | AGTCCTACGT | CCAGTGCCAG | GGGATCCCGC | 2553 |
| AGGGCTCCAT | CCTCTCCACG | CTGCTCTGCA | GCCTGTGCTA | CGGCGACATG | GAGAACAAGC | TGTTTGCGGG | 2623 |
| GATTGGGCGG | GACGGGCTGC | TCCTGCGTTT | GGTGGATGAT | TTCTTGTGTTG | TGACACCTCA | CCTCACCAC | 2693 |
| GCGAAAACCT | TCCTCAGGAC | CCTGGTCCGA | GGTGTCCCTG | AGTATGGCTG | CGTGGTGAAC | TTGCGGAAGA | 2763 |
| CAGTGGTGAA | CTTCCCTGTA | GAAGACGAGG | CCCTGGGTGG | CACGGCTTTT | GTTCAGATGC | CGGCCCACGG | 2833 |
| CCTATTCCCC | TGGTGCGGCC | TGCTGCTGGA | TACCCGGACC | CTGGAGGTGC | AGAGCGACTA | CTCCAGCTAT | 2903 |
| GCCCGGACCT | CCATCAGAGC | CAGTCTCACC | TTCAACCGCG | GCTTCAAGGC | TGGGAGGAAC | ATGCGTCGCA | 2973 |
| AACTCTTTGG | GGTCTTGCGG | CTGAAGTGTC | ACAGCCTGTT | TCTGGATTTG | CAGGTGAACA | GCCTCCAGAC | 3043 |
| GGTGTGCACC | AACATCTACA | AGATCCTCCT | GCTGCAGGCG | TACAGGTTTC | ACGCATGCGT | GCTGCAGCTC | 3113 |
| CCATTTTCATC | AGCAAGTTTG | GAAGAACCCC | ACATTTTTC | TGCGCGTCAT | CTCTGACACG | GCCTCCCTCT | 3183 |
| GCTACTCCAT | CCTGAAAGCC | AAGAACGCAG | GTATGTGCAG | GTGCCTGGCC | TCAGTGGCAG | CAGTGCCTGC | 3253 |
| CTGCTGGTGT | TAGTGTGTCA | GGAGACTGAG | TGAATCTGGG | CTTAGGAAGT | TCTTACCCCT | TTTCGCATCA | 3323 |
| GGAAGTGGTT | TAACCCAACC | ACTGTCAGGC | TCGTCTGCCC | GCCCTCTCGT | GGGGTGAGCA | GAGCACCTGA | 3393 |
| TGGAAGGGAC | AGGAGCTGTC | TGGGAGCTGC | CATCCTTCCC | ACCTTGCTCT | GCCTGGGGAA | GCGCTGGGGG | 3463 |
| GCCTGGTCTC | TCCTGTTTGC | CCCATGGTGG | GATTTGGGGG | GCCTGGCCTC | TCCTGTTTGC | CCTGTGGTGG | 3533 |
| GATTGGGCTG | TCTCCCGTCC | ATGGCACTTA | GGGCCCTTGT | GCAAACCCAG | GCCAAGGGCT | TAGGAGGAGG | 3603 |
| CCAGGCCACG | GCTACCCAC | CCCTCTCAGG | AGCAGAGGCC | GCGTATCACC | ACGACAGAGC | CCGCGCCCGT | 3673 |
| CCTCTGCTTC | CCAGTCACCG | TCCTCTGCCC | CTGGACACTT | TGTCCAGCAT | CAGGGAGGTT | TCTGATCCGT | 3743 |
| CTGAAATTCA | AGCCATGTCG | AACCTGCGGT | CCTGAGCTTA | ACAGCTTCTA | CTTTCTGTTC | TTTCTGTGTT | 3813 |
| GTGGAGACCC | TGAGAAGGAC | CCTGGGAGCT | CTGGGAATTT | GGAGTGACCA | AAGGTGTGC | | 3872 |

Fig. 15

Abb. A

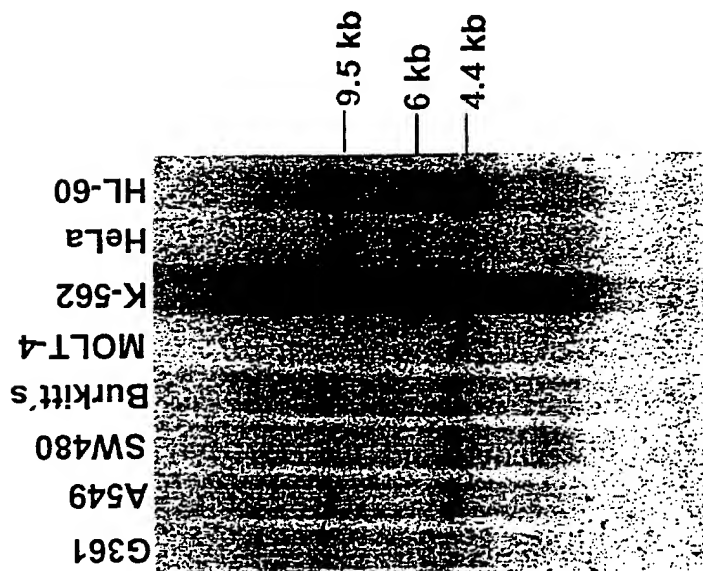


Abb. B

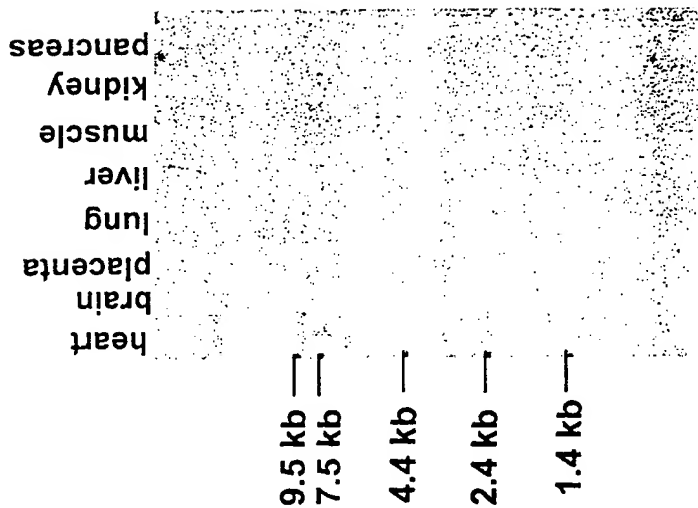
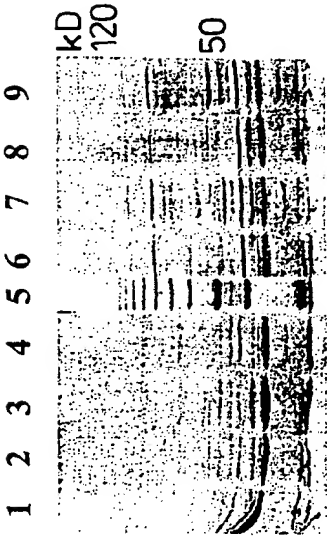


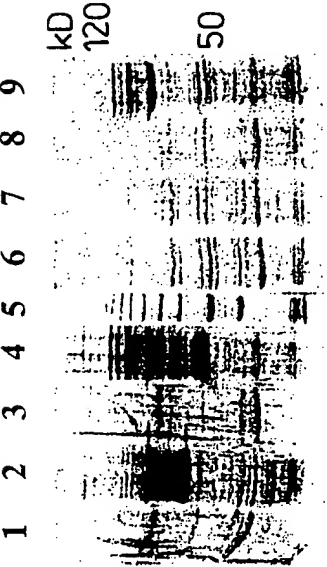
Fig. 16

Abb. A



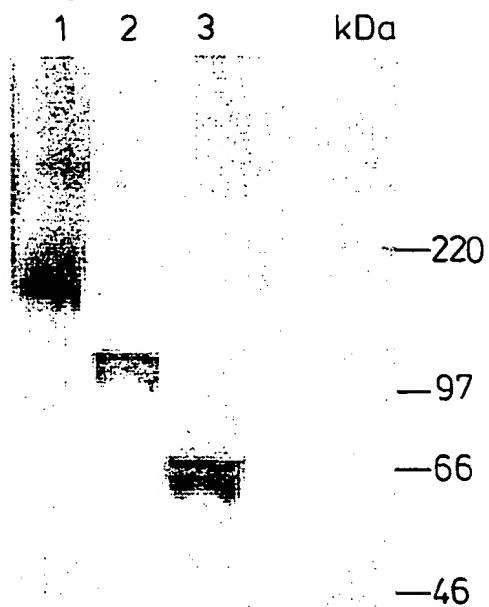
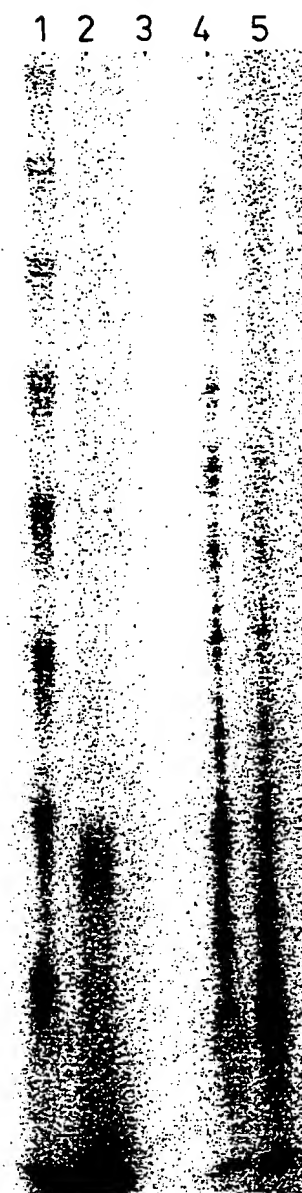
| pMAL | pMAL | pMAL | M | pMAL | pMAL | pMAL |
|------------------|------|------|----|------------------|------|------|
| EST | AI | AI | AI | EST | AI | AI |
| - | + | - | + | - | + | + |
| anti-B pre-immun | | | | anti-C pre-immun | | |

Abb. B



| pMAL | pMAL | pMAL | M | pMAL | pMAL | pMAL |
|------------------|------|------|----|------------------|------|------|
| EST | AI | AI | AI | EST | AI | AI |
| - | + | - | + | - | + | + |
| anti-B 1° immun. | | | | anti-C 1° immun. | | |

- 15 / 15 -

Fig. 17**Fig. 19****Fig. 18**